

**Experimentelle Untersuchungen
über den Einfluß von Proteinen und Diabeti-
kerseren auf die Cholesterinsynthese
in vitro und in vivo**

Brigitte Kroeger geb. Graubner

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

**Experimentelle Untersuchungen
über den Einfluß von Proteinen und Diabeti-
kseren auf die Cholesterinsynthese
in vitro und in vivo**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Brigitte Kroeger geb. Graubner
aus Stettin

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. W. SEITZ

Dekan:

Prof. Dr. R. BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 17.3.1964



Meinem Vater
in Dankbarkeit und Verehrung gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

1. Arteriosklerose und Cholesterinstoffwechsel
2. Die Cholesterinsynthese
3. Zur Regulation des Cholesterinstoffwechsels
4. Problemstellung

II. EXPERIMENTELLER TEIL

A. IN VITRO VERSUCHE

Technik der in vitro Versuche

1. Herstellung des Enzymsystems
2. Die Inkubation
3. Isolierung des neugebildeten Cholesterins
4. Darstellung des neugebildeten Cholesterins
5. Bestimmung der Radioaktivität

B. IN VIVO VERSUCHE

Technik der in vivo Versuche

1. Bestimmung des Lebercholesterins
2. Bestimmung des Serumcholesterins

III. ERGEBNISSE

A. IN VITRO VERSUCHE

1. Albumin
2. α -Globulin
3. β -Globulin
4. γ -Globulin
5. Einfluß von Diabetikerseren auf die Cholesterinsynthese

B. In vivo Versuche

IV. DISKUSSION

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. LITERATURANGABEN

EINLEITUNG

1. Arteriosklerose und Cholesterinstoffwechsel

Die Anschauungen über die Pathogenese der Arteriosklerose sind immer noch nicht ganz einheitlich. Vor allem das Cholesterin steht dabei im Brennpunkt des Interesses, und über seine Rolle wird immer wieder diskutiert. (1-15)

Diese bevorzugte Stellung in der Arterioskleroseforschung verdankt es im wesentlichen folgenden Befunden:

a. Histochemisch:

In den Plaques arteriosklerotischer Gefäße werden chemisch-analytisch und histologisch als Hauptbestandteile freies Cholesterin und seine fettsauren Ester gefunden, was schon WINDAUS 1910 entdeckt hatte.

b. Ernährung:

Immer wieder hervorgehoben wird auch die Feststellung, daß bei angeblich nur vegetativ und mangelhaft ernährten Völkern autoptisch seltener Arteriosklerose angetroffen wird als bei fettreich ernährten. Auch nimmt sie in Kriegs- und Mangelzeiten deutlich ab.

c. 1912 gelang ANITSCHKOW bei Tieren, die mit cholesterinreicher Kost ernährt wurden, Gefäßveränderungen hervorzufufen, die der menschlichen Arteriosklerose stark ähnelten. (Gegen diese Beobachtungen wurden hauptsächlich wegen der Menge des verfütterten Cholesterins zahlreiche Einwände erhoben, jedoch ist eine gewisse Verwandtschaft sicherlich nicht abzustreiten).

d. Krankheiten, die mit hohen Cholesterinkonzentrationen einhergehen, neigen in besonderem Maße zur Arteriosklerose. Dies gilt vor allem für hereditäre Lipoidstoffwechselentgleisungen, wie die essentielle familiäre Hypercholesterinämie und die Xanthomatosen, bei denen es nach THANNHAUSER zu Ablagerungen von Cholesterin in die Intima- und Subintimazellen kommt, während die Einlagerung im Alter extracellulär nach vorheriger Gefäßwandschädigung erfolgt, - für den Morbus Hand-Schüller-Christian, bei dem es sich um eine Cholesterinspeicherkrankheit handelt. Stoffwechselerkrankungen, bei denen der Lipoidstoffwechsel in Mitleidenchaft gezogen ist, gehen mit einer Häufung atheromatöser Gefäßprozesse einher, zum Beispiel der Diabetes mellitus, bei dem durch den Insulinmangel die Fettverbrennung gestört ist und dadurch Acetoacetat im Organismus anfällt, über dessen Kondensation dann vermehrt Cholesterin gebildet wird. Ferner trifft dies für Lipoidnephrose, nephrotisches Syn-

drom, Myxödem, die chronische Pankreatitis, und in gewisser Weise trifft es auch für die Fettsucht zu.

- e. Mit zunehmendem Alter nimmt der Cholesteringehalt des Serums zu (BÜRGER, SCHETTLER, KEYS), daraus werden immer wieder Schlüsse gezogen auf die vorwiegend altersbedingte Häufung der Arteriosklerose.
- f. Der Zusammenhang zwischen Coronarsklerose und Cholesterin gilt als ziemlich gesichert, da nach Herzinfarkten der Cholesterinspiegel oft erhöht ist.
- g. Außerdem haben GCFMANN und Mitarbeiter häufig cholesterinreiche Fetteiweißmoleküle bei Coronarinfarkt und generalisierter Arteriosklerose aus dem Serum isoliert, denen sie eine Bedeutung für die Entstehung der Arteriosklerose zuschreiben (4).

Diese Punkte scheinen in der Tat außerordentlich stark für eine entscheidende Rolle des Cholesterin im gesamten Arteriosklerosegeschehen zu sprechen. Amerikanische Autoren sehen auch heute noch eine sichere Korrelation zwischen Arteriosklerose und Cholesterinspiegel, so daß die Serumkonzentration ein wichtiger Faktor ist, um die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, mit der eine künftige Coronarerkrankung und allgemeine Arteriosklerose zu erwarten ist (KEYS 13).

Zweifelloos gibt es zahlreiche Fälle, für die diese Annahme zutrifft; zum Beispiel die essentielle familiäre xanthomatöse Hypercholesterinämie. Jedoch sind deutsche Arterioskleroseforscher davon nicht unbedingt überzeugt, weil (oder zumal) manche Beobachtungen gegen die ausschließliche, ja führende Rolle des Cholesterin, ja sogar gegen seine Bedeutung für die Arteriosklerose überhaupt sprechen. Trotz zahlreicher Untersuchungen habe sich kein linearer Zusammenhang zwischen Cholesterinspiegelerhöhung und Gefäßerkrankung ergeben, so daß die Hypercholesterinämie allein nicht als wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung der menschlichen Arteriosklerose anzusehen sei (GLATZEL 12). Wenn aber die Veränderungen an der Intima in das Stadium der fettigen Degeneration getreten sind, dann wird dies ohne Zweifel durch hohen Cholesteringehalt des Blutes oder eine geringe Lösungskapazität für dasselbe, wesentlich verstärkt.

Dagegen scheint ursächlich eine Störung des gesamten Lipoidhaus-

haltes zugrunde zu liegen, wodurch es zu Verschiebungen des Gleichgewichts im Auf- und Abbau kommt, zu abnormem Transport der Lipide oder zu einer Klärinsuffizienz (SCHÖN 15, 14), und dadurch zu einer relativen und absoluten Vermehrung unter anderem auch des Cholesterins, oder ganz allgemein zu einer Vermehrung der höher molekularen Verbindungen, auf Kosten der niedermolekularen, sowie zu einer Vermehrung der β -Lipoproteide und Verminderung der α -Lipoproteide.

Bei der ungenauen Kenntnis der wahren Primärursachen bleibt daher häufig nichts anderes übrig, als dort einzugreifen, wo man eine Teilursache vermutet, und sei es als prophylaktische oder als therapeutische Maßnahme, den hohen Cholesterinspiegel zu vermindern. In bestimmten Fällen ist dies sogar unbedingt erforderlich, beispielsweise bei der essentiellen Hypercholesterinämie, die mit Serumerhöhungen bis über 1000 mg% einhergeht, und bei malignem Verlauf mit Ablagerung in fast allen inneren Organen.

Die Schwierigkeiten, die damit verbunden sind, liegen darin, daß Cholesterin endogen im Organismus selbst gebildet werden kann, etwa zu 80%, in der Hauptsache in der Leber, und daß sich dieser Prozeß der Kontrolle entzieht. Außerdem ist der Serumgehalt keineswegs immer symptomatisch für den tatsächlichen Gehalt in den Geweben. Aufgrund der heutigen Kenntnisse vom Cholesterinstoffwechsel gibt es drei Möglichkeiten einzugreifen,

1. Alimentär, eine Verminderung der Aufnahme des Cholesterin aus der Nahrung oder eine Verringerung der Resorption aus dem Darm. Bisher mußte man sich in der Therapie auch weitgehend auf eine cholesterin- und fettarme Diät beschränken, fettarm deshalb, weil sich herausgestellt hat, daß die Gesamtfett- bzw. die Kalorienzufuhr zusammen mit Cholesterin, mitbestimmend für die Höhe des Cholesterinspiegels ist. Eine ganze Reihe von Autoren sind allerdings der Ansicht, daß das mit der Nahrung zugeführte Cholesterin den Serumspiegel nicht beeinflusst, vielmehr beruhe die Hypercholesterinämie auf einer gesteigerten endogenen Synthese, die ihrerseits durch ein Überwiegen gesättigter Fette in der Nahrung stimuliert wird.
2. Anregung der Cholesterinausscheidung durch Anregung des Metabolismus z.B. durch Thyreoideapräparate bzw. durch Steigerung der biliären Exkretion.
3. Hemmung der Biosynthese.

In der letzten Zeit haben sich eine Anzahl von Arbeitsgruppen bemüht, Stoffe zu finden, die die Biosynthese des Cholesterins hemmen, jedoch ist der therapeutische Erfolg bisher sehr fraglich, einmal wegen der Nebenwirkungen der gefundenen Substanzen, zum anderen, weil die Synthese ja an irgendeiner Stelle blockiert wird und sich so Vorstufen im Organismus anreichern, über deren Wirkungsweise noch weitgehend Unklarheit herrscht. Therapeutische Maßnahmen, die allein die Biosynthese des Cholesterins betreffen, müssen eigentlich zwangsläufig nur für bestimmte Formen der Arteriosklerose vorbehalten bleiben. - Von amerikanischer Seite wird jedoch neuerdings die Blockierung der Biosynthese des Cholesterins als ein entscheidender Faktor des therapeutischen Fortschritts hinsichtlich Coronarinfarkt und Arteriosklerose bezeichnet. Ob allerdings diese allein auf das Cholesterin und dessen Synthese abgestellten Maßnahmen tatsächlich für die Therapie zu empfehlen sind, bleibt abzuwarten.

Klinisch wirklich wertvoll scheinen nach dem neuesten Stand der Kenntnisse solche Verbindungen zu sein, die das Cholesterin aus dem Organismus eliminieren, anstatt umzulagern, und zwar dadurch, daß sie das normale Cholesterinolyse- und Lipolysevermögen des Blutes wiederherstellen, wodurch die Relationen der Lipoprotein- und Glycoprotein-Fraktionen stabilisiert und auch die häufig erniedrigten Phospholipoidwerte wieder normalisiert werden. Das endogene Cholesterin zu beseitigen, genügt nicht, da dadurch die Leber zu vermehrter Aktivität angeregt wird (SCHETTLER).

Es gibt also schon gewisse Möglichkeiten der Therapie und der Prophylaxe, wenn auch die meisten diesbezüglichen Probleme noch der Lösung harren.

2. Die Cholesterinsynthese.

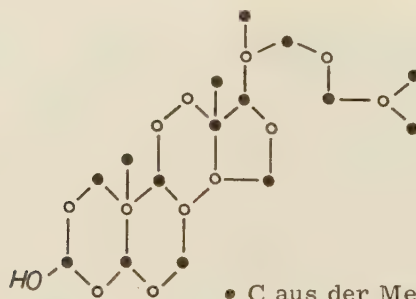
Um zu verstehen, an welchen Reaktionsschritten der Cholesterinsynthese sich das Interesse im Hinblick auf Blockierungsmöglichkeiten konzentriert, sei hier der Weg des Aufbaus zur Veranschaulichung beschrieben (16-30).

Vom biochemischen Standpunkt ist die Erforschung der Hemmungsmechanismen sehr aktuell, schon allein deshalb, weil auch auf diese Weise neue Wege über den Reaktionsablauf erschlossen werden können. Seit 30 Jahren etwa weiß man aus Bilanzversuchen, daß der Körper Cholesterin synthetisieren kann, aber erst Isotopenversuche haben gelehrt, daß es aus relativ kleinen Bausteinen, nämlich aus

Acetateinheiten aufgebaut wird.

Bei Experimenten an Hefe entdeckten 1937 SONDERHOFF und THOMAS (18), daß Essigsäure beim Aufbau der Sterine Verwendung finden muß, als sie beobachteten, daß an der Methylgruppe mit Deuterium markiertes Acetat in die Steroidfraktionen der Ansätze eingebaut wurde. Später konnte BLOCH den Nachweis führen (23-25), daß alle 27 C-Atome des Cholesterins aus Essigsäure stammen, und überdies ergänzt durch Untersuchungen von POPJACK und CORTORT (27) auch die Verteilung des Methyl- und Carboxylkohlenstoffes festlegen können. Somit stellt die Essigsäure die Muttersubstanz der Steroide dar.

Außerdem wiesen sie nach, daß auch Leucin bzw. Isovaleriansäure zu den biologischen Vorstufen des Cholesterins zählen - die Schritte sind im einzelnen noch nicht bekannt.



CHOLESTERIN (C27)

• C aus der Methylgruppe

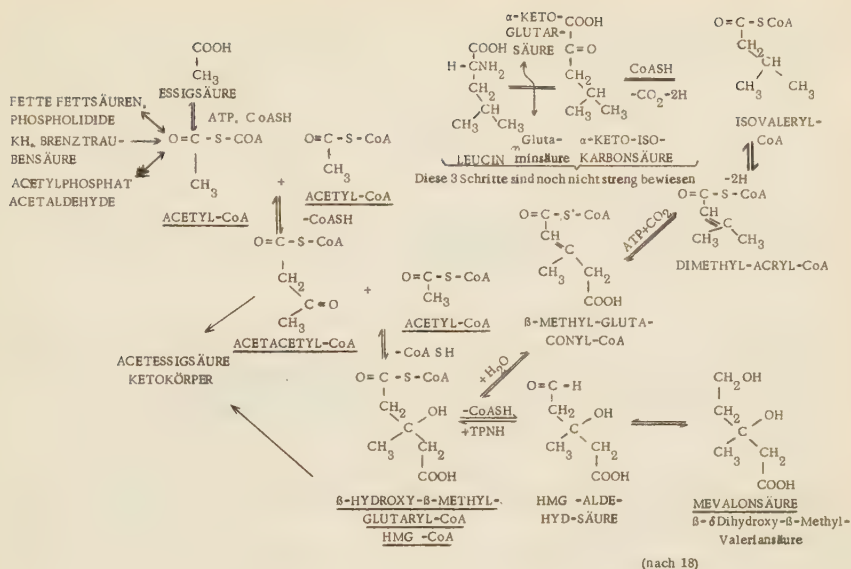
○ C aus der Carboxylgruppe

(Wir setzten bei unseren Versuchen 1-C¹⁴-Acetat ein, in dem resultierenden Cholesterin ist dann jeweils das aus der Carboxylgruppe stammende C-Atom markiert).

Die Synthese verläuft über verschiedene Zwischenstufen, wobei sich drei entscheidende Schritte herauskristallisieren.

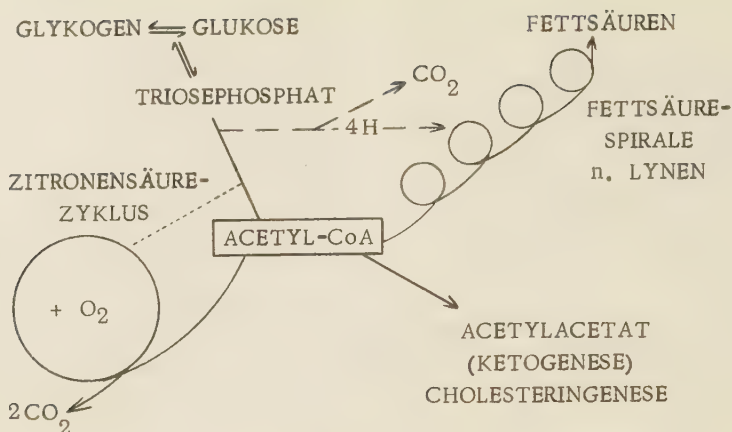
1. Aus der Essigsäure erfolgt unter Mitwirkung von Coenzym A die Biosynthese isoprenoide Monocarbonsäuren.
2. Die nächste Stufe stellt das Squalen dar, ein Terpenkohlenwasserstoff, das durch die Kondensation mehrerer aktiver Isopreneinheiten schrittweise aufgebaut wird.
3. Die Bildung des Cholesterins aus dem Squalen erfolgt durch Faltung und Ringbildung des Moleküls, wobei wiederum verschiedene Zwischenstufen durchlaufen werden.

Im einzelnen geht die Synthese wie folgt vor sich.



Damit eine Kondensation der Essigsäuremoleküle stattfinden kann, müssen diese reaktionsfähig gemacht, das heißt, aktiviert werden. Dieser Vorgang erfolgt am Schwefel des Coenzym A-Moleküls in Form einer Thioesterbildung mit Hilfe von ATP als Energielieferant. Die folgenden Reaktionen bis zur Mevalonsäure sind ATP-unabhängig.

Die aktivierte Essigsäure stellt den Mittelpunkt zahlreicher biologisch wesentlicher Stoffwechselvorgänge dar. Mit ihr beginnt die Synthese der Sterine, die aerobe Phase der Kohlenhydratverbrennung, und sie ist auch eine Schlüsselsubstanz im Fettstoffwechsel.

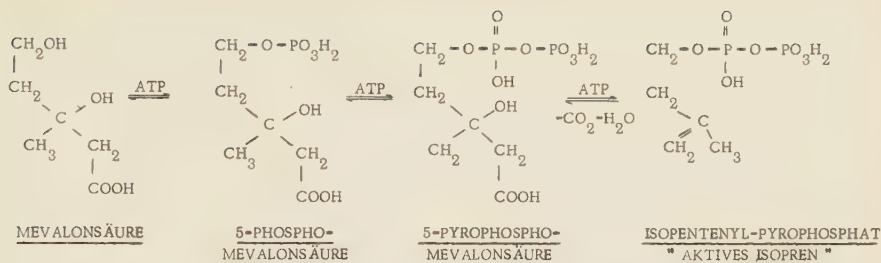


Zentrale Stellung des Acetyl-CoA in der Synthese der Fettsäuren und des Cholesterins.

Nach J. Polonowski aus Bansi/Schwarting, Klinik der Gegenwart VII 103.

Nach der Aktivierung der Essigsäure ist der erste Schritt in dem langen Aufbauweg getan, die Bildung von Acetacetyl-CoA aus zwei Molekülen Acetyl-CoA. Diese Kondensation leitet also den biologischen Aufbau der Kohlenstoffketten des Cholesterins und der Fettsäuren ein. (Dieses wurde beim Studium der Fettsynthese gefunden)(18,21). Bis zum Acetacetyl-CoA verlaufen beide Synthesen gemeinsam, an dieser Stelle trennen sich die Wege. Als nächstes erfolgt die Verbindung von Acetacetyl-CoA mit Acetyl-CoA zum Coenzym A-Derivat des β -hydroxy- β -methyl-glutarylsäure = HMG - CoA, das sich als eine äußerst wichtige Zwischenstufe erwies (18,21,22). Einmal vermag die Leber aus HMG-CoA über Acetessigsäure Ketokörper zu bilden, ein grundlegender Zusammenhang mit dem Diabetes, zum anderen stellt das HMG - CoA selbst eine Station auf dem Abbauweg der deswegen ketogenen Aminosäure Leucin dar; folglich kann dieser Weg auch in die Cholesterinsynthese einmünden (s. S. 11).

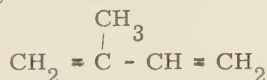
Die HMG-Säure trägt noch eine CoA-Gruppe, diese wird durch Reduktion abgespalten, den Wasserstoff liefert TPNH und es entsteht über die HMG-Aldehydsäure die Mevalonsäure. FOLKERS (18) entdeckte diese isoprenoide Monocarbonsäure und hatte damit die Schlüsselsubstanz und den universellen Baustein der Isoprenoide gefunden.



Die nächste Stufe wird eingeleitet durch die Phosphorylierung der Mevalonsäure in Stellung 5. Die so gebildete 5-Phosphomevalonsäure wird noch einmal phosphoryliert: es resultiert die 5-Pyrophosphomevalonsäure. Die doppelten Phosphorylierungsvorgänge verbrauchen in besonderem Maße ATP. Mit der Einführung dieser sogenannten energiereichen Phosphate ist zugleich, gewissermaßen als Regulationsmechanismus, eine "Bremse" in die Reaktionskette eingefügt (18).

Das bedeutet, daß das Ausmaß der Synthese nicht wie bei den vorhergehenden Schritten im wesentlichen von dem Angebot der Cofaktoren, etwa wie TPNH bei der Reduktion des HMG-CoA zur Mevalonsäure, oder ATP bei der ersten Phosphorylierung, abhängig ist, sondern auch von dem Verbrauch der gebildeten 5-Pyrophosphomevalonsäure.

Durch Decarboxylierung und Dehydatisierung, wobei ebenfalls ATP benötigt wird, entsteht das Isopentenylpyrophosphat, das sogenannte "aktive Isopren". Dieser ungesättigte Kohlenwasserstoff findet sich als Grundgerüst in zahlreichen pflanzlichen und tierischen Produkten (Terpenen, Sterinen, Carotinoiden), die sich formal in Isopreneinheiten zerlegen lassen.



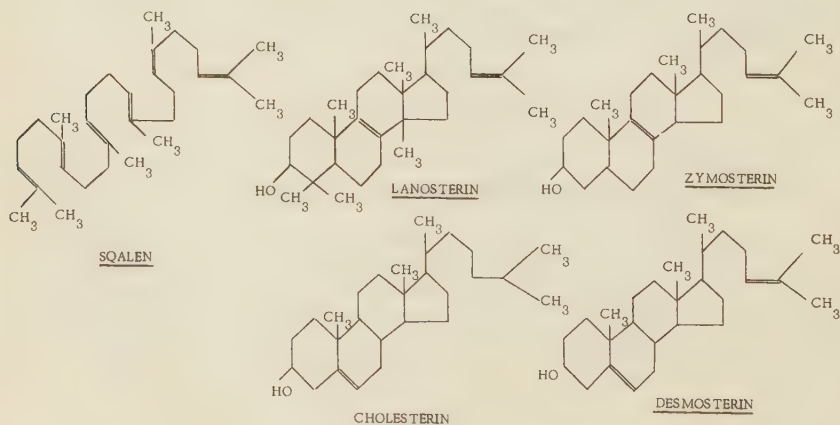
Mit der Erkenntnis, daß Cholesterin zu diesen Naturstoffen gehört,

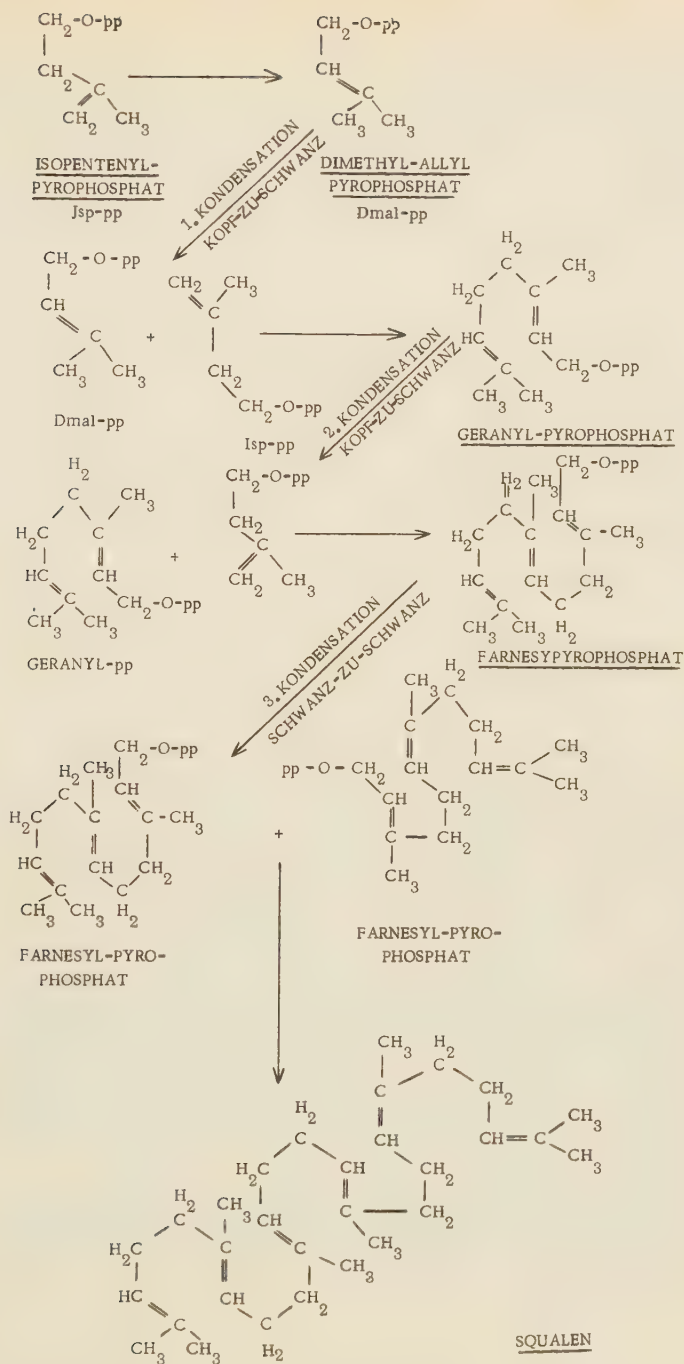
- schon 1922 stellt RUZICKA (29) diese Forderung durch Aufstellen der "Isoprenregel"-, war der erste bedeutende Anstoß für die Aufklärung der Cholesterinsynthese gegeben (23 - 30). Das Isopentenylpyrophosphat geht nun eine Kettenreaktion ein (17, 18, 26, 27) (s. S. 15).

Bevor es zu einer Polymerisation des aktiven Isoprens kommt, erfolgt mit Hilfe einer Isomerase die Umlagerung eines Moleküls, was zum Dimethyl-allyl-pyrophosphat führt. Anschließend findet die erste Kondensation - Kopf zu Schwanz - eines Moleküls Isopentenylpyrophosphat mit einem Molekül Dimethyl-allyl-pyrophosphat statt, wobei sich das pyrophosphattragende Ende des Dimethyl-allyl-pyrophosphat (Schwanz) mit der Methylengruppe (Kopf) unter Freisetzung der Phosphate zum Geranylpyrophosphat vereinigt. Durch erneute gleichartige Kondensation (Kopf zu Schwanz) mit einem Molekül Isopentenylpyrophosphat bildet sich Farnesylpyrophosphat. Zwei Moleküle Farnesylpyrophosphat verbinden sich dann schließlich zum Squalen.

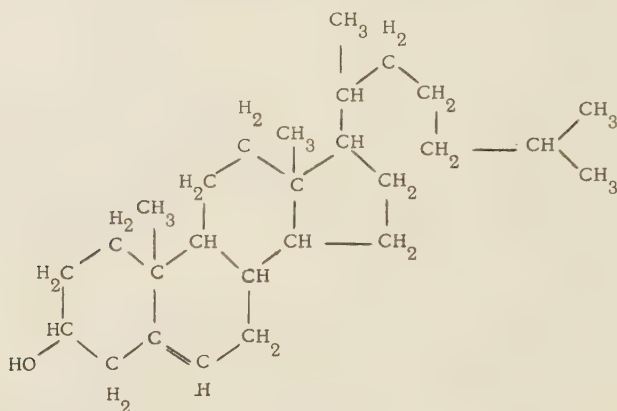
Das Squalen war eigentlich das erste Zwischenprodukt in der Synthesekette, das aufgefunden und in seiner Struktur aufgeklärt wurde durch HEILBRONN, OWEN, KAMM (18). Schon 1926 hatte SHANNON (18, 21) aus Fütterungsversuchen geschlossen, daß es beim Steroidaufbau eine Rolle spielen müsse.

Der endgültige Beweis, daß Squalen wirklich ein Zwischenprodukt der Cholesterinsynthese ist, wurde erst 1953 von LANGDON und BLOCH (23 - 25) geführt. Mit Hilfe der Isotopentechnik gelang es ihnen den Weg der Biosynthese zu verfolgen. Sie verfütterten markiertes Acetat (1-C^{14} -Acetat, $\text{CH}_3\text{-C}^{14}\text{OOH}$), isolierten markiertes Squalen, verfütterten dies erneut und erhielten endlich radioaktiv markiertes Cholesterin.





Aus dem Squalen bildet sich durch oxydative Zyklisierung zum Steranskelett als erstes faßbares Produkt das Lanosterin. Es hat noch drei Methylgruppen mehr als das Cholesterin. Die Decarboxylierung und Änderung der Stellung der Doppelbindung erfolgt stufenweise über Zymosterin und Desmosterin um endlich bei der Endstufe der Reaktionskette anzulangen, dem Cholesterin.



CHOLESTERIN

3. Zur Regulation des Cholesterinstoffwechsels.

Wenn man zu therapeutischen Zwecken Substanzen verwenden will, die den Cholesterinspiegel zu senken vermögen, dann müßte man sich natürlich über den Wirkungsmechanismus derselben im klaren sein. Der Erkenntnisweg ist mit großen Schwierigkeiten verbunden, daher harrt bisher vieles noch der Erforschung.

Da das Ganze ein sehr komplexes Geschehen ist, kann man den Cholesterinstoffwechsel nicht isoliert betrachten, sondern muß ihn in den Gesamtmetabolismus einbeziehen. Eine genauere Kenntnis der homöostatischen Regulation der Lipogenese unter physiologischen Bedingungen und besonders deren spezifisch chemischen Mechanismen wäre erforderlich, um von daher einen Anhalt zu haben, wo die Untersuchungen nach den Angriffsmöglichkeiten von Inhibitoren am günstigsten und gezielt anzusetzen sind.

Aber auch die zufällige Entdeckung von Hemmstoffen kann in der Erkenntnis des Reaktionsablaufs und dessen Steuerung weiterführen. - Diesen Problemkreis hat MASORO (32) eingehend studiert und die

Möglichkeit von Ansatzpunkten diskutiert. Seine Untersuchungen galten allerdings der Fettsäuresynthese, aber im Prinzip treffen seine Ergebnisse auch für die Cholesterinsynthese zu. Wie für die Fettsäurebilanz, so kommt auch für den Cholesterinhaushalt der aufgenommenen Fettmenge und ihrem Gehalt an Cholesterin bei der Regulierung des Spiegels eine große Bedeutung zu. Desgleichen wird wohl auch dem Angebot an Acetyl-CoA eine Rolle als regulierender Kraft beizumessen sein. Überhaupt ist die Synthesegeschwindigkeit ganz empfindlich von der bereitgestellten Menge an Coenzym A abhängig. Dabei scheint es eine optimale Konzentration zu geben, oberhalb und unterhalb welcher die Syntheserate abfällt. Dadurch kann der Coenzym A-Spiegel tatsächlich als Regulator dienen.

Das Coenzym A ist im Organismus für die Acetylierungsvorgänge notwendig. Seine Blockierung würde die endogene Cholesterinsynthese praktisch ausschalten. Da es außerdem eine Schlüsselsubstanz im Intermediärstoffwechsel darstellt, würden zugleich wichtige andere Stoffwechselvorgänge mitbetroffen, so daß über die Koppelungsmechanismen die einzelnen Zyklen sich gegenseitig beeinflussen und dadurch steuern können.

Die enzymatischen Abläufe, mit denen die Cholesterinsynthese verbunden ist, haben sicherlich ebenfalls durch die unterschiedliche Aktivität der Enzyme eine Kontrollfunktion auszuüben.

Neuere Informationen über die spezifisch-chemische Natur dieser Reaktionen haben Aufschluß gegeben über manche bisher ungeklärte Hemmungen. So scheint ein sehr labiles Enzym in der Synthesekette die β -Hydroxy- β -Glutaryl-reduktase zu sein, auf deren Induktion die Wirkung der Schilddrüsenhormone auf den Cholesterinspiegel zurückzuführen ist (41). Derartigen Substanzen, die bei den enzymkatalysierten Schritten spezifisch einzugreifen vermögen, wird bei der Suche nach Inhibitoren besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

Seit einiger Zeit weiß man aus Tierversuchen, daß bei der Zufuhr größerer Mengen Cholesterin die endogene Synthese stark eingeschränkt wird, allerdings läßt die Höhe des Serumspiegels keinen Rückschluß auf die Syntheserate zu.

SIEPERSTEIN (33) hat nun versucht, eine Erklärung hierfür zu finden. Er zeigte, daß in Rattenleberschnitten C¹⁴-markiertes Acetat während der Fütterung einer cholesterinhaltigen Diät in ungleich geringerem Maße in Cholesterin eingebaut wird als ohne eine solche Diät. Mevalonsäure und Squalen werden dagegen unter dem Einfluß einer Cholesterindiät sogar noch etwas besser in Cholesterin über-

führt. Die Blockierung der Cholesterinsynthese muß also auf dem Wege von der Essigsäure zur Mevalonsäure eintreten. Da Acetyl-CoA und Acetacetyl-CoA auch noch Zwischenprodukte beim Aufbau langkettiger Fettsäuren sind, HMG-CoA dazu noch beim Aufbau von Ketokörpern, bei der Verfütterung von Cholesterin sich jedoch eine wesentliche Behinderung der Synthese dieser Stoffe nicht ergab, konnte der Punkt, an dem exogenes Cholesterin die Synthese blockiert, also bei der Umwandlung von HMG-CoA in Mevalonsäure ermittelt werden.

Natürlich ist es nicht möglich, Cholesterin in der Arteriosklerosetherapie zu verwenden.

In der Praxis hat sonst bereits eine ganze Reihe von Stoffen Anwendung gefunden, die sich klinisch durchaus bewährt haben. Zum Teil wirken sie über den Umweg der Selbstregulation, zum Teil greifen sie direkt in den Cholesterinabbau ein.

Von einigen kann man sich das Wirkprinzip ungefähr ableiten.

Am längsten bekannt ist der lipoidsenkende Effekt polyensäurenreicher Fette (6, 7, 8, 9, 10, 14, 47), der dadurch bedingt wird, daß die Polyensäuren eine Besserung der Klärfähigkeit des Blutes bewirken (15).

Auf demselben Mechanismus beruht der Erfolg mit Heparin und Heparinoiden (6).

Das Sitosterin, dem teilweise ein recht günstiger Einfluß zugeschrieben wird, bindet die Gallensäuren im Duodenum und vermindert so die Cholesterinresorption (6).

Die essentiellen Phospholipoide, die in letzter Zeit immer häufiger erwähnt werden, vermögen offensichtlich die pathologischen Neutralfett- und Gesamtlipidspektren zu normalisieren, wobei dann der Cholesterinspiegel auch wiederhergestellt wird (6).

Von den meisten anderen, die zwar größtenteils in der Therapie Verwendung finden, ist der spezifische Mechanismus, durch welchen diese Faktoren die Syntheserate senken, noch weitgehend unbekannt. Im Experiment erwiesen sie sich zumeist als sehr erfolgversprechend, manchmal mit Hemmungen bis auf 0-10%. Zu diesen Stoffen gehören unter anderen; Nicotinsäure und ihre Amide (38), Phenyläthyllessigsäure u. ä., Gallensäuren (37), und über diese wirkend Neomycin, das die Gallensäure abbauenden Bakterien vernichtet, Oestrogene usw. (6) Betrachtet man den Weg der Synthese mit

seinen drei wichtigsten Reaktionsstufen:

1. Essigsäure - Mevalonsäure
2. Mevalonsäure - Squalen
3. Squalen - Cholesterin,

so scheint es offensichtlich, daß einer von diesen Schritten physiologisch und ohne ersichtlich nachteilige Folgen gehemmt werden könnte.

Eine Blockierung der Synthese auf den Sterinstufen erscheint wenig sinnvoll, weil sich dann diese dem Cholesterin verwandten Verbindungen im Körper anreichern und möglicherweise ebenfalls bei der Arterioskleroseentstehung eine Rolle spielen. So hemmt beispielsweise das Triparanol (Mer 29) den letzten Schritt der Synthese und es kommt zur Anhäufung von Desmosterin (36).

Auch die Blockierung vor der Mevalonsäure könnte gefährlich sein, weil dadurch andere wichtige Stoffwechselschritte betroffen würden.

Nach diesen Überlegungen wäre es also am günstigsten, zwischen Mevalonsäure und Squalen einzugreifen (34). Untersuchungen in der Richtung werden in Amerika vielfach schon durchgeführt, u. a. von dem Arbeitskreis um POPJACK, der versucht, das Farnesylpyrophosphat so abzuwandeln, daß eine Hemmung der Cholesterinsynthese resultiert (35).

So ist also sowohl auf biochemischer wie auch auf klinischer Seite noch alles im Fluß. Manche Zusammenhänge gelang es schon zu klären, jedoch vor der Formulierung endgültiger Aussagen bedarf es noch einer großen Anzahl von Detailerkenntnissen.

4. Problemstellung.

Aus der Kachexie, die bei Menschen mit malignen Tumoren fast obligat auftritt, kann darauf geschlossen werden, daß offensichtlich Neoplasmen mit Störungen in der Fettsynthese einhergehen. Als Ursachen dieser Hemmwirkung werden eine ganze Reihe von Faktoren in Betracht gezogen, und ganz sicher gibt es nicht nur eine mögliche Ursache. Im Hinblick auf den Gesamtstoffwechsel muß es dabei wohl an bisher noch nicht ausreichend bekannten Schlüsselstellen zu Fehlreaktionen kommen, wodurch auch der Lipidstoffwechsel in Mitleidenschaft gezogen wird.

Da sich bei Krebskranken ausgesprochene Verschiebungen im Ei-

weißstoffwechsel zeigen, deutlich erkennbar an der Nivellierung der Fraktionen in der Serum-Elektrophorese, lag die Vermutung nahe, daß hier vielleicht ein Zusammenhang zu suchen sein könnte, daß also möglicherweise die Plasmaproteine einen Einfluß auf den Lipidstoffwechsel haben. Es ist ja bekannt, daß zur Fettsynthese grundsätzlich alle Stoffe herangezogen werden können, die im Organismus zu aktivem Acetat beziehungsweise zu C_2 -Metaboliten abgebaut werden, also Kohlenhydrate, Aminosäuren oder Proteine, und Fette selbst.

Daher sollten die einzelnen Stoffwechselzyklen auf ihre gegenseitige Abhängigkeit durch die gemeinsamen Reaktionsschritte geprüft werden, mit der speziellen Fragestellung nach eventuell sich ergebender Hemmung der Fettsäure- und Cholesterinsynthese.

In der vorliegenden Arbeit soll nun unter Laborbedingungen in vitro und in vivo nachgewiesen werden, in wie weit die Plasmaproteine im Stande sind, speziell die Cholesterinsynthesefähigkeit der Leber herabzusetzen, und welche Unterschiede sich zwischen Albumin und den einzelnen Globulinen feststellen lassen.

Um nicht nur die Eigenschaften der Humaneiweiße zu erfahren, setzen wir Eiweiße verschiedener Herkunft ein.

Für die in-vitro-Versuche verwandten wir ein aus Taubenlebern gewonnenes lösliches Enzymsystem, das nach Angaben, die BUCHER (45, 46) für Rattenlebern machte, Cholesterin und höhere Fettsäuren zu synthetisieren vermag. Zur Unterscheidung des neugebildeten von dem bereits in der Leber vorhandenen Cholesterin wurde radioaktiv markiertes 1 - C^{14} -Natrium-Acetat als Ausgangssubstanz eingesetzt. Bei der Isolierung des Gesamtcholesterins konnte dann das neugebildete durch Messung der spezifischen Aktivität abgetrennt und quantitativ ausgewertet werden.

Um festzustellen, inwieweit sich die in-vitro erzielten Ergebnisse auf in-vivo Verhältnisse übertragen lassen, erprobten wir den Effekt der gleichen Substanzen an lebenden Tauben.

In diesem Zusammenhang schien von großem Interesse, auch die Kopplungen des Kohlenhydrat- mit dem Fettstoffwechsel zu überprüfen.

In den vorangegangenen Kapiteln wurde deutlich gemacht, in welcher enger Beziehung die Cholesterinsynthese und überhaupt der ganze Lipidstoffwechsel mit dem Kohlenhydratstoffwechsel stehen.

Umfangreiches experimentelles Beweismaterial liegt vor, daß bei der Lipogenese Insulin ganz maßgeblich beteiligt ist. Mit Recht wird immer wieder auf die für Diabetes fast pathognomonische Fettsucht hingewiesen, und da die Kohlenhydrate das wichtigste Ausgangsmaterial zur Fettbiosynthese bilden, einigermaßen erklärlich. Aus diesem Grunde setzten wir bei gleicher Versuchsanordnung Diabetikerseren als Testsubstanz ein, um zu sehen, ob sie irgend einen Einfluß auf die Synthesefähigkeit haben. Diese Versuche führten wir allerdings nur *in vitro* durch.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

In den Grundzügen folgten unsere Versuche den Präparationsangaben, die BRADY und GURIN (42) für die Neubildung von Fettsäuren beschrieben haben. Im Gegensatz zu ihnen benutzten wir Taubenlebern als Ausgangsmaterial für das lösliche Enzymsystem, da diese infolge der hohen Aktivität des acetataktivierenden Enzyms in größerem Umfang freies Acetat zu Cholesterin und höheren Fettsäuren aufzubauen vermögen. Schon früher wurde nämlich festgestellt, daß im Durchschnitt Taubenlebern 10-15% mehr von dem eingesetzten 1-C^{14} -Natriumacetat zur Synthese verwerten als die ursprünglich angegebenen Rattenlebern. Dabei treten allerdings beträchtliche Schwankungen auf, was wohl auf die Stoffwechsellage der Tiere zurückzuführen ist. Von entscheidender Bedeutung erwiesen sich hierbei Alter und Ernährungszustand der Tauben. Um auch wirklich eine maximale Einbaurate zu erzielen, ist es daher notwendig, nur junge, 6-9 Monate alte, gesunde Tauben zu nehmen, die vorher längere Zeit reichlich mit Kohlenhydraten (nur Weizenkörnern) gefüttert worden sind. Ganz besonders muß darauf geachtet werden, keine Hungertauben zu erhalten, da Hunger die Cholesterin- und Fettsäuresynthese ganz erheblich herabsetzt, wie Versuche von v. BRAND und HELMREICH gezeigt haben (43).

Folgende Versuche wurden unternommen:

1. *In vitro* Versuche

- a. Bestimmung der Cholesterinsynthesehemmung durch Zugabe verschiedener Proteine

- b. Bestimmung der Cholesterinsynthesehemmung durch Zugabe von Diabetikerseren
2. In vivo Versuche
 - a. Bestimmung der Cholesterinsynthesefähigkeit der Lebern von Tauben, die mit verschiedenen Proteinen gespritzt worden waren
 - b. Bestimmung des Serumcholesterinspiegels dieser Tauben
3. Vergleich mit den parallel laufenden Fettsäuresynthesehemmungsversuchen.

A. Technik der in vitro Versuche

1. Herstellung des Enzymsystems

Je nach Anzahl der Versuchsansätze, der sich ergebenden Leberausbeute und, um schon an dieser Stelle die individuelle Schwankungsbreite so weit wie möglich auszuschalten, verarbeiteten wir 3 - 5 Taubenlebern zu einem Versuchsansatz. Die Tauben werden mittels Scherenschlag dekapitiert, die Lebern sofort entnommen und in Eiswasser gelegt, anschließend auf Filterpapier abgetupft, von Blut, Bindegewebe und Fett - die die Synthesefähigkeit stark beeinträchtigen können - gereinigt, sehr klein geschnitten und gewogen. Für elf Ansätze sind 30 g Leber die günstigste Menge. Um ein zellfreies Enzymsystem - supernatant fluid = "sup" - zu gewinnen, wird die abgewogene Lebermenge mit der 1,2-fachen Menge eines Phosphat-Hydrogenkarbonat-Puffers versetzt (Zusammensetzung: 0,085 mK₂HPO₄, 0,009 mK₂PO₄, 0,07 KHCO₃ zu gleichen Teilen; pH = 7,4) - (43, 44) und zur Zerstörung der Zellwände vorsichtig in einem Handhomogenisator nach "Potter-Elvehjem" homogenisiert. Dabei entspricht 1 g Leber 0,8 ml. des Gemisches.

Es ist zu beachten, daß alle diese Maßnahmen stets bei annähernd 0°C durchgeführt werden, da das Enzymsystem sehr wärmeempfindlich ist (2, 8). Das auf diese Weise erhaltene Homogenat wird nun zur Entfernung der Zellbestandteile zuerst 45 min. lang bei einer Umdrehungszahl von 2000 U/min. im Eisschrank zentrifugiert. Der resultierende Überstand - es darf kein Bodensatz dazukommen! - wird mit dem gleichen Puffer erneut verdünnt, und zwar so weit, daß jetzt 4 ml Homogenat einer Ausgangsmenge von 3 g Leber entsprechen, also auf das 1,33-fache Lebergewicht aufgefüllt wird. Dieses Gemisch wird nochmals 75 min bei 25 000 U/min zentrifugiert. Der

so gewonnene Überstand wird für die Versuche als Enzymdonator verwendet und als supernatant fluid = "sup" bezeichnet. In ihm befinden sich alle zur Cholesterin- und Fettsäuresynthese benötigten löslichen Enzyme. Er ist frei von Zellbestandteilen, enthält jedoch noch Mitochondrien und Mikrosomen, die sich erst bei 100 000 U/min setzen würden (42, 43). Eine solche Ultrazentrifuge stand uns aber leider nicht zur Verfügung.

2. Die Inkubation

Im Laufe der Inkubation erfolgt die eigentliche in vitro-Synthese des Cholesterins und der Fettsäuren aus dem aktiven Acetat in dem von WARBURG beschriebenen Inkubator.

Dazu wurden in jeden Versuchsansatz 2,3 ml des in der angegebenen Weise aufbereiteten Enzymsystems gegeben; das entspricht etwa einer Menge von 2 g Leber.

Um mit dem eingesetzten aktiven Natrium-C¹⁴-Acetat auch tatsächlich eine maximale Ausbeute an neugebildetem markierten Cholesterin und Fettsäuren zu erreichen, sind außer den im sup enthaltenen Fermenten noch bestimmte geeignete Cofaktoren notwendig, wie Magnesiumchlorid, das die Fermente aktiviert, und Natriumcitrat - ohne das der Einbau von C¹⁴-Acetat nicht vonstatten geht -, die in optimaler Konzentration zugegeben werden.

Diesem Ausgangsgemisch wird nun die jeweils zu prüfende Substanz beigegeben.

Ein Ansatz sieht demnach folgendermaßen aus: (n. 43, 44)

a. Konstante Zusätze:

0,1 ml MgCl ₂	Endkonzentration im Ansatz	0,006 m
0,1 ml Na-citrat	" " "	0,01 m
0,4 ml Na-C ¹⁴ -acetat	" " "	0,008 m
2,3 ml Enzymsystem ("sup") in Phosphat-Bicarbonat-Puffer.		

b. nicht konstante Zusätze:

Testsubstanz

Aqua dest. oder Puffer, bis in allen Versuchen eine Gesamtmenge von 3 ml erreicht ist.

Alles dieses wird in 20 ml-Warburg-Kölbchen einpipettiert, die Kölbchen verschlossen und drei Stunden bei $38^{\circ} \pm 1^{\circ}$ unter ständigem

leichten Schütteln im "Warburg-Apparat" inkubiert.

3. Isolierung des neugebildeten Cholesterins und der Fettsäuren.

Um beides isolieren zu können, wird das Inkubationsgemisch zuerst verseift und anschließend Cholesterin und Fettsäuren mit Petroläther extrahiert. Zur Verseifung wird der Inhalt jedes Warburgkölbchens mit 7 ml Aqua bidest. in ein birnenförmiges Schliff-Kölbchen von 50 ml Volumen übergespült und nach Zugabe von 5 ml 30%-iger alkoholischer KOH und 25 mg Palmitinsäure als Träger-substanz unter ständigem Rückfluß bei schwachem Sieden verseift.

Zur Extraktion wird nach der Verseifung das abgekühlte Reaktionsgemisch zusammen mit 20 ml Petroläther in einen Scheidetrichter gefüllt und durch Zusatz von 18% HCL bis zum Umschlag des Indikators (5 Tropfen Bromkresyl-Methylorange) leicht angesäuert. Durch viermaliges Ausschütteln mit Petroläther (Siedepunkt 30° - 50°) werden die gebildeten Fettsäuren und das Cholesterin aus dem Verseifungsgemisch herausgewaschen und die Petrolätherauszüge jeweils in kleinen Bechergläsern über einem Wasserbad langsam eingedampft. In dem Rückstand, der in einem 10 ml Kölbchen mit Petroläther bis zur Marke aufgefüllt wird, sind die gesamten aus dem aktiven Acetat synthetisierten höheren Fettsäuren und Cholesterin enthalten.

Für die folgende Cholesterinbestimmung wurden 4 ml davon entnommen und die restlichen 6 ml zur Bestimmung der Fettsäuren verwandt (43).

4. Darstellung des neugebildeten Cholesterins.

Bis hierher verläuft die Isolierung des Cholesterins mit der Aufbereitung zur Gewinnung der markierten Fettsäuren parallel.

Zur Darstellung des markierten Cholesterins werden 4 ml der Testlösung - s. o. - in Reagenzgläsern im Wasserbad bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 4 ml Bloor'scher Lösung (3 Teile 96% Alkohol - 1 Teil Äther) gelöst, mit drei Tropfen 2 n KOH gegen zwei Tropfen Phenolphthalein ausreichend alkalisiert und im Wasserbad 1 Stunde lang bei 37° - 38° verseift.

Im Gegensatz zu HINKELMANN (47) wurde nach SUND (47), um eine

Selbstabsorption zu vermeiden und die Plättchenbeschickung möglichst dünn zu halten, kein Cholesterin dazugegeben. Die Reindarstellung des Cholesterin erfolgt durch Fällung mit 1% Digitonin in 50% Alkohol, wodurch sich unlösliches Cholesterindigitonid bildet. Diese Fällung bleibt über Nacht stehen, danach wird der Niederschlag mit einem Filtriergerät¹ auf Filterplättchen² filtriert. Um alle Reste von Fett und unspezifischen Substanzen zu entfernen, wäscht man mit einer Alkohol-Äther-Mischung 1 : 1 nach.

5. Bestimmung der Radioaktivität.

Nachdem die Filterplättchen absolut trocken geworden sind, wird die Ausbeute an Cholesterin durch die Messung der Impulse des 1-C-^{14} Cholesterins ermittelt, das sich auf den Plättchen beim Filtrieren abgelagert hat.

Gemessen wird im Methandurchflußzähler³ bei gleicher Spannung und konstantem geometrischen Abstand. An Hand eines Uranstandardpräparates bekannter Aktivität (ca 4000 Imp./min) konnten die Schwankungen, hervorgerufen durch den sehr empfindlichen Apparat, kontrolliert und durch Umrechnung auf den jeweiligen Standardwert ausgeglichen werden.

Im einzelnen wurde folgendermaßen bei den Messungen vorgegangen. Als Ausgangswert diente in jeder Versuchsreihe ein Ansatz ohne Zusatz einer hemmenden oder fördernden Testsubstanz. Dieser Ansatz entspricht also der synthetisierenden Fähigkeit des verwendeten Enzymsystems und wird im Vergleich zu den anderen Versuchsansätzen derselben Reihe gleich 100% gesetzt. Alle erhaltenen Impulszahlen werden jeweils in Prozenten dieser Ausgangsaktivität ausgedrückt. Auf diese Weise ist es möglich, die Ergebnisse ohne weiteres direkt miteinander zu vergleichen, obwohl die Ausgangsradio-

¹ Filtriervorrichtung für radiochemische Arbeiten der Firma Schott & Gen., Mainz

² Papierfilterplättchen, "Selekt" der Firma Schleicher & Schull, Nr. 566, Durchmesser 2,8 cm

³ Methandurchflußzähler FH51 der Firma Friesecke & Höpfner, Erlangen Bruck 2 Zählrohr FH512, Spannung 3700 Volt Diskriminatorstellung 10.

Normaltieren gewonnenen Durchschnittswerte.

Wir verwendeten bei diesen Versuchen ebenfalls junge gut ernährte Tiere, die auch während der Versuche ausreichend weiterfressen müssen. Drei Tage vor Versuchsbeginn kommen sie in Einzelkäfige.

Technik der in vivo Versuche

1. Bestimmung des Lebercholesterins

Die Tauben werden getötet, die Lebern sofort entnommen, von anhaftendem Bindegewebe und Gefäßen freipräpariert, auf Filterpapier getrocknet und gewogen. Anschließend wird die abgewogene Lebermenge mit der äquivalenten Menge Aqua bidest. versetzt und 2 min. lang in einem hochtourigen Homogenisator¹ homogenisiert. 10 g des Homogenates (entsprechen 5 g Leber) werden in einem Rundkolben von 1 l Volumen eingewogen. Unter Schwenken des Kolbens gibt man langsam, um eine Zusammenballung zu vermeiden, 500 ml Bloor'sche Lösung zu.

Um die Fette zu extrahieren, wird dieses Gemisch zunächst 1 Stunde bei 70°C im Wasserbad unter ständigem Rückfluß erhitzt, danach der Überstand durch einen Filter (ϕ 15 cm) gegossen und der Rückstand mit etwa 200 ml Chloroform und 40 ml Methanol nochmals 1/2 Stunde extrahiert.

(Das Chloroform löst die Fette, das Methanol dient der vollständigen Ausfällung der Eiweiße). Anschließend wird alles, auch der Rückstand, wieder durch das gleiche Filter gegeben und mit Chloroform nachgespült.

Die so erhaltene Lösung wird im Wasserbad bei 50°C im Vakuum bis zur Trockne eingedampft, zum restlichen Wasserentzug 20 ml absoluter Alkohol hinzugefügt und nochmals bis zur Trockne destilliert. Der Rückstand wird in 5 ml Petroläther gelöst, durch ein kleines Filter in ein 25 ml Meßkölbchen filtriert, 2-3 mal mit je 5 ml Petroläther nachgewaschen und bis zur Marke aufgefüllt (44).

In dieser Lösung sind die gesamten Fette und Cholesterin enthalten.

4 ml davon werden zur weiteren Darstellung des Cholesterins verwendet, die nach der bereits angegebenen Methode durchgeführt wird.

1 "Homogenisator für wissenschaftliche Zwecke" der Firma E. Bühler, Tübingen, für Drehzahlen bis 50000 U/min.

2. Bestimmung des Serumcholesterins.

Bei der Serumcholesterinbestimmung folgen wir den Methoden von SPERRY (49) und ZACK (50) in Anlehnung an eine Mitteilung von ZÖLLNER (48). Das Blut der dekapitierten Tauben wird in Reagenzgläsern aufgefangen, sobald wie möglich zentrifugiert und das Serum vom Blutkuchen getrennt. Hämolytisches Serum wird verworfen.

a. Herstellung des Lipoidextraktes (49)

1 ml Serum wird in einem 25 ml Meßkölbchen zu 8,3 ml Methanol getropft, dabei der Kolben vorsichtig geschüttelt, damit man eine möglichst feine Fällung der Proteine erreicht, 9 ml Chloroform zugegeben und im Wasserbad kurz zum Sieden gebracht. Nach dem Abkühlen füllt man bis zur Marke mit Chloroform auf und filtriert den Extrakt - der auf diese Weise von den Eiweißen getrennt wird - sehr schnell, um Verdunstung zu vermeiden, durch ein weiches schnelllaufendes Faltenfilter.

b. Reinigung des Lipoidextraktes.

Von dem Filtrat werden 20 ml in einen 25 ml Schüttelzylinder pipetiert, 4 ml 0,02% wäßrige CaCl_2 -Lösung hinzugefügt und etwa eine Minute lang kräftig geschüttelt. Durch Zugabe des Wassers klärt sich das Gemisch in eine obere Wasser-Methanol-Phase, die alle nichtlipiden Verunreinigungen (Aminosäuren, Kohlenhydrate, Elektrolyte) aufnimmt, und eine untere lipoidhaltige Phase, kurz "untere Phase" genannt. Ihr Volumen beträgt etwa 14 ml und muß zur Berechnung genau abgelesen und notiert werden. Die obere Phase wird quantitativ mit einer feinen Kapillare abgesaugt und verworfen.

c. Einengung des Lipoidextraktes.

Die untere Phase stellt den sogenannten Sperry-Extrakt dar und kann direkt weiterverarbeitet werden.

Dazu wird 1 ml Extrakt im Wasserbad bei 60° - 80°C (knapp über dem Siedepunkt des verwendeten Lösungsmittels) vollständig eingedampft und noch vorhandene Lösungsmittelreste durch Stickstoffbegasung entfernt. Man muß aufpassen, daß die eingetrockneten Lipide umgehend im nächsten Lösungsmittel aufgenommen werden, sie dürfen nicht lange trocken stehen bleiben, weil sonst die Ergebnisse ungenau werden.

d. Bestimmung des Gesamtcholesterins.

Diese Bestimmung erfolgte nach ZACK (50) mit Hilfe der Eisenchloridreaktion (Liefschütz'sche Reaktion).

Zu dem Eindampfrückstand gibt man sofort 3 ml Eisessig, unterschichtet nach dessen völliger Lösung mit "Reagenz" (zu 7,5 ml konzentrierter Schwefelsäure werden 0,5 ml 10% wäßrige FeCl_3 -Lösung gegeben, nach Mischen auf 50 ml mit konzentrierter Schwefelsäure aufgefüllt) und vermischt alles sehr rasch mit einem Glasstab.

Nach etwa $1/2$ - 1 stündigem Stehen im Dunkeln (längere Einwirkung von Licht zerstört die gebildete Farbe) wird gegenüber einem Leerwert im Photometer (Eppendorf, Filter 546) photometriert. Parallel dazu wird ein Standardwert bestimmt:

50 γ Cholesterin in 3 ml Eisessig, der in der 10 mm Cuvette abgelesen, Extinctionswerte zwischen 0,230 und 0,260 ergibt.

Berechnet wird nach der angegebenen Formel

$$\frac{\delta \times \text{Spiegelwert}}{16} = \text{mg \% Cholesterin,}$$

$$\text{wobei: } \delta = \frac{\text{Ext. Probe} \times 100}{\text{Ext. Standard}} \quad \text{ist.}$$

Der Cholesterinspiegel der Diabetikerseren wurde aus Nativblut ebenfalls nach dieser Methode bestimmt.

III ERGEBNISSE

A. IN-VITRO-VERSUCHE

Der Einfluß von Eiweißfraktionen auf die Cholesterinsynthese.

Tabelle I: Die Zahlen geben die Impulse wieder, die mit einem Ansatz erhalten werden. Sie entsprechen der Cholesterinsynthese, wobei der Sup-Wert, d.h. der Versuchswert ohne Zusatz, jeweils 100% ist.

In den letzten Reihen sind jeweils die Prozente des Mittelwertes der gleichlaufenden Versuche bezogen auf den Mittelwert des Sups als 100% angegeben.

Zum Vergleich sind in der letzten Spalte der Tabelle die entsprechenden Werte aus der Fettsynthese aufgeführt.

1. ALBUMIN

Humanalbumin 50 mg

lfd. Nr.	Sup.	Alb.hum.	Cholest.Synth. %	Fetts.Synth. %
1172	561	365	65	70
1173	609	275	45,1	67,4
1174	602	439	72,9	78
1178	603	386	64	71
Summe	2375	1465		
Mittel	594	366		

Durchschnittl. Hemmung d. Chol. Synth. 61,7

Durchschnittl. Hemmung d. Fetts. Synth. 71,0

Albumin bovin 50,mg

lfd.Nr.	Sup.	Alb.bov.	Cholest.Synth. %	Fetts.Synth. %
1146	608	557	91,6	105,6
1157	790	724	91,6	107,4
1162	638	560	87,8	81,6
1167	413	388	93,9	84
1177	515	443	86	91
Summe	2964	2672		
Mittel	593	534		

Durchschnittl. Hemmung d. Chol. Synth. 90,0

Durchschnittl. Hemmung d. Fetts. Synth. 94,5

Eieralbumin, 50 mg

lfd.Nr.	Sup.	Eieralbum.	Cholest.Synth. %	Fetts.Synth. %
1152	139	69	49,6	44,7
1166	341	87	25,5	21,2
1167	413	104	25,2	18,2
1171	524	211	40,2	33,8
1178	603	182	30,2	27,9
Summe	2020	653		
Mittel	404	131		

Durchschnittl. Hemmung d. Cholest. Synth. 32,4

Durchschnittl. Hemmung d. Fetts. Synth. 30,9

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ließ sich mit Albumin bovin überhaupt kein Einfluß auf die Synthese erzielen. Humanalbumin dagegen hemmte etwas und Eialbumin bewirkte eine ausgesprochene Hemmung bis auf 30%. Worauf diese unterschiedlichen Eigenschaften chemisch ähnlich strukturierter Substanzen, die nur verschiedener Herkunft sind, beruhen, ist unbekannt. (Vielleicht spielen Herstellungsverfahren und Verunreinigungen eine gewisse Rolle).

Jedenfalls ist der Unterschied der Wirkung von Eialbumin und Albumin bovin ganz eklatant und kann kein zufälliges Ergebnis sein.

2. -GLOBULIN

α -Globulin human, 50 mg

Ifd. Nr.	Sup.	-Glob. h.	Cholest. Synth.	Fetts. Synth.
			%	%
1146	608	495	81,4	89,6
1147	593	445	75,0	76,0
1155	843	597	70,8	72,1
1159	396	287	72,5	99,9
1170	505	338	66,9	65,2
Summe	2945	2162		
Mittel	589	432		

Durchschnittl. Hemmung d. Cholest. Synth. 73,5

Durchschnittl. Hemmung d. Fetts. Synth. 78,0

α -Globulin bovin, 50 mg

Ifd. Nr.	Sup.	-Glob. bov.	Cholest. Synth.	Fetts. Synth.
			%	%
1134	944	229	24,3	19,1
1139	530	183	34,6	17,3
1151	318	130	40,9	26,3
1158	189	84	44,5	20,0
1161	545	156	28,6	24,2
Summe	2426	782		
Mittel	485	156,5		

Durchschnittl. Hemmung d. Cholest. Synth. 32,3

Durchschnittl. Hemmung d. Fetts. Synth. 22,4

Auch hier zeigte sich wieder eine deutliche Differenz zwischen ana-

logen Substanzen. Durch das α -Globulin bovin beobachteten wir bei allen Versuchen dieser Reihe den maximalsten Effekt, sowohl in der Cholesterin- als auch in der Fettsäuresynthesehemmung. Zeitweilig gingen die Werte unter 20% der Ausgangsaktivität zurück, mindestens aber unter 50%. Mit α -Globulin human hingegen erreichten wir eine vergleichsweise geringere Hemmung.

3. β -GLOBULIN

β -Globulin human, 50 mg

lfd. Nr.	Sup.	β -Glob. h.	Cholest. Synth. %	Fetts. Synth. %
1142	841	560	66,5	38,7
1147	593	366	61,7	55
1148	219	108	49,3	48,2
1170	505	280	55,4	59,5
1177	515	291	56,5	58,9
Summe	2673	1605		
Mittel	534	321		

Durchschnittl. Hemmung d. Cholest. Synth. 60,0

Durchschnittl. Hemmung d. Fetts. Synth. 50,2

β -Globulin bovin, 50 mg

Lfd. Nr.	Sup.	β -Glob. bov.	Cholest. Synth. %	Fetts. Synth. %
1145	309	190	61,4	51,9
1165	140	78	55,7	57,8
1169	372	232	62,3	48
1171	524	243	46,4	46
1173	609	284	46,6	58,9
Summe	1954	1027		
Mittel	390	205		

Durchschnittl. Hemmung d. Cholest. Synth. 52,6

Durchschnittl. Hemmung d. Fetts. Synth. 52,5

β -Globulin beeinflusste die Cholesterinsynthese mit 50%-iger Hemmung deutlich, erstaunlicherweise lagen aber hier die Ergebnisse bei bovinem und humanem β -Globulin etwa gleich.

Cholesterin- und Fettsäuresynthesehemmung durch β -globulin bovin

sind gleich und korrespondieren mit dem Fettsäuresyntheseabfall durch β -Globulin human. Nur der Hemmwert für die Cholesterinsynthese des β -Globulin bovin liegt ein wenig, um 10%, höher.

4. γ -GLOBULIN

γ -Globulin bovin, 50 mg

lfd. Nr.	Sup.	-Glob. bov.	Cholest. Synth. %	Fetts. Synth. %
1155	843	696	82,6	94,5
1165	140	100	71,4	56,5
1166	341	288	84,4	84,6
1168	411	347	84,5	83,2
1169	372	287	77,2	53
Summe	2107	1718		
Mittel	421	343		

Durchschnittl. Hemmung d. Cholest. Synth. 81,5

Durchschnittl. Hemmung d. Fetts. Synth.

74,4

Für das γ -Globulin stand uns leider zum Vergleich kein humanes zur Verfügung, so daß wir nur das bovine prüfen konnten, welches eine unbedeutende Hemmung aufweist.

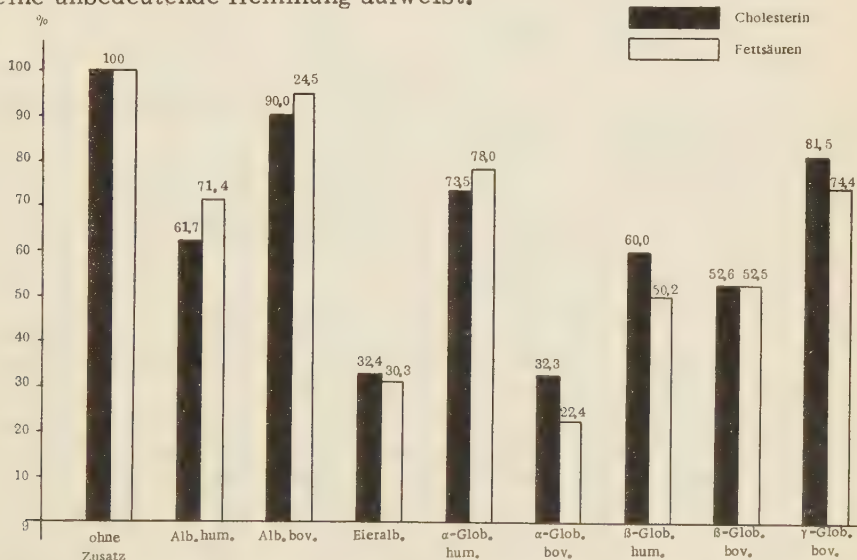


Abb. 1: Ausbeute an radioaktiv markiertem Cholesterin und Fettsäuren in Prozent der Synthese eines Normalversuches in Abhängigkeit von zugesetzten verschiedenen Proteinen.

Die Abbildung 1 veranschaulicht noch einmal, was schon aus den Tabellen deutlich hervorging, daß eine sehr auffällige Parallelität zwischen der Cholesterin- und der Fettsäuresynthese besteht. (Die geringen Schwankungen innerhalb der einzelnen Versuche können durchaus innerhalb der physiologischen Schwankungsbreite liegen.)

Eier-Albumin und α -Globulin bovin zeigen die besten Ergebnisse. Albumin bovin hemmt offensichtlich überhaupt nicht, beim Albumin human, α -Globulin human, γ -Globulin bovin ist der Einfluß wenig hervorstechend, während mit beiden β -Globulinen sich gute Ergebnisse erzielen lassen.

Einfluß von Diabetikerseren auf die Cholesterin-Synthese.

Serum von folgenden Patienten wurde verwendet:

Pat. Nr.:	60 Jahre,	weiblich,	Größe: 155 cm,	Gewicht: 55 kg
1	Anamnese:	Diabetes seit 1 Monat festgestellt		
	Blutbefund:	Zucker	5.4.	8.5. 21.6.
		in mg% 9 ⁰⁰	198	222 264
		11 ⁰⁰	224	230 264
		Cholesterin		
		in mg %		248
	Harnbefund:	Zucker $\emptyset$		
		Aceton $\emptyset$		
	Therapie:	Diät		
Pat. Nr.:	59 Jahre,	weiblich,	Größe: 167 cm,	Gewicht: 52 kg
2	Anamnese:	Diabetes seit 1951		
	Blutbefund:	Zucker	18.2. 25.2. 2.3. 20.3. 1.4. 9.5.	
		in mg% 9 ⁰⁰	145	213 218 323
		11 ⁰⁰	247	338 213 276 350 314
		Cholesterin		
		in mg %		296 284
	Harnbefund:	Zucker in g	41,1	44,2 44,0
		Aceton	$\emptyset$	$\emptyset$ +++
	Therapie:	seit 1956 eingestellt mit Insulin und Invenol, Diät.		
Pat. Nr.:	62 Jahre,	weiblich,	Größe: 168 cm,	Gewicht: 79,3 kg
3	Anamnese:	Diabetes seit 1 Monat festgestellt		
	Blutbefund:	Zucker	11.4. 29.4. 17.5.	
		in mg % 9 ⁰⁰		
		11 ⁰⁰	385	90 88

		Cholesterin in mg %		246	250
	Harnbefund:	Zucker in g	Ø		
		Aceton	+	Ø	Ø
	Therapie:	Diät			
Pat.Nr.: 4	36 Jahre,	männlich, Größe: 178 cm, Gewicht: 79,3 kg			
	Anamnese:	Diabetes festgestellt Anfang Mai d.J.			
	Blutbefund:	Zucker	14.5.	24.5.	
		in mg %	9 ⁰⁰	64	62
			11 ⁰⁰	130	73
		Cholesterin in mg %		237	238
	Harnbefund:	Zucker Ø			
		Aceton: Spur			
	Therapie:	Diät			
Pat.Nr.: 5	39 Jahre,	männlich, Größe: 177 cm, Gewicht: 77 kg			
	Anamnese:	Diabetes seit 1959, März 1963 Hypoglyk. Schock			
	Blutbefund:	Zucker	19.4.	26.4.	8.5.
		in mg %	9 ⁰⁰	352	132
			11 ⁰⁰	168	119
					173
		Cholesterin in mg %		248	
	Harnbefund:	tägl. Zuckerausscheidung 50 g			
		Aceton: Spuren			
	Therapie:	Einstellung mit Insulin, Diät			
Pat.Nr.: 6	31 Jahre,	männlich, Größe: 172 cm, Gewicht: 76 kg			
	Anamnese:	Diabetes seit 1958			
	Blutbefund:	Zucker: sehr starke Schwankungen 88 - 246 mg%			
		Cholesterin	1959	244 mg %	
			19.5.1963	243 mg %	
	Harnbefund:	Zucker Ø			
		Aceton Ø			
	Therapie:	eingestellt mit Insulin			
Pat.Nr.: 7	42 Jahre,	weiblich, Größe: 164 cm, Gewicht: 81 kg			
	Anamnese:	Adipositas, Diabetes seit Dez. 1962			
	Blutbefund:	Zucker	4.3.	6.3.	25.3.
		in mg %	9 ⁰⁰	166	145
			11 ⁰⁰	133	213

Harnbefund: Zucker in g $\emptyset$ 7,5
 Aceton $\emptyset$ $\emptyset$
 Therapie: Diät

Pat.Nr.: 22 Jahre, weiblich, Größe: 164 cm, Gewicht: 60 kg
 8 Anamnese: Diabetes, bei der Aufnahme festgestellt
 Blutbefund: Zucker 5.4.
 in mg % 9^{oo}
 11^{oo} 141
 Harnbefund: Zucker $\emptyset$
 Aceton $\emptyset$
 Therapie: Diät, eingestellt mit Insulin

Pat.Nr.: 65 Jahre, weiblich, Größe: 155 cm, Gewicht 72 kg
 9 Anamnese: Diabetes, seit 15 Jahren
 Blutbefund: Zucker 23.4. 29.4. 7.5. 17.5. 22.5. 27.5.
 in mg % 9^{oo} - 204 251 177 198 148
 11^{oo} 216 139 199 146 91 137
 Harnbefund: Zucker in g: 0,8% 28 6 9 21 5
 Aceton $\emptyset$
 Therapie: Diät, eingestellt mit Insulin

Pat.Nr.: 82 Jahre, männlich, Größe: 175 cm, Gewicht: 93,2 kg
 10 Anamnese: Diabetes seit April 1959
 Blutbefund: Zucker 30.1. 27.2. 29.3. 3.5.
 in mg % 9^{oo} 212 227 343 293
 11^{oo} 259 204 385 174
 Harnbefund: Zucker 2% $\emptyset$ $\emptyset$ $\emptyset$
 Aceton $\emptyset$
 Therapie: Diät, eingestellt mit Insulin

Pat.Nr.: 73 Jahre, weiblich, Größe: 156 cm, Gewicht: 78,7 kg
 11 Anamnese: Diabetes seit Dez. 1963, Coma?
 Blutbefund: Zucker 5.3. 3.5.
 in mg % 9^{oo} 150 135
 11^{oo} - -
 Harnbefund: Zucker $\emptyset$
 Aceton $\emptyset$
 Therapie: -

Pat.Nr.: 46 Jahre, weiblich,
 12 Anamnese: Diabetes seit 1951

Blutbefund: Zucker 24. 5.
 in mg % 9^{00} -
 11^{00} 174
 Harnbefund: Zucker $\emptyset$
 Aceton $\emptyset$
 Therapie: eingestellt mit Insulin, Diät

Pat. Nr.: 66 Jahre, männlich, Größe: 166cm, Gewicht: 71,5 kg
 13 Anamnese: Diabetes seit Frühjahr 1959
 Blutbefund: Zucker 17. 5. 28. 5.
 in mg % 9^{00} 280 143
 11^{00} 124 -
 Cholesterin 15.10.59
 in mg % 168
 Harnbefund: Zucker in g 31 $\emptyset$
 Aceton $\emptyset$ $\emptyset$
 Therapie: Diät

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE DER DIABETIKERSEREN

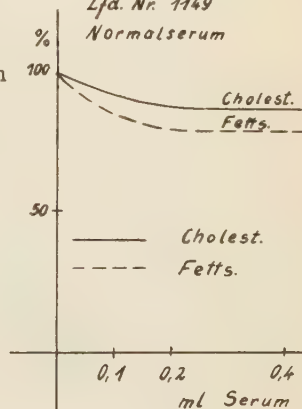
Tabelle II zeigt die prozentuale Hemmung der Cholesterinsynthese durch die einzelnen Diabetikerseren, in Abhängigkeit von der Konzentration (s. Abb. 2). Zum Vergleich sind die entsprechenden Werte aus der Fettsäuresynthese aufgeführt.

Normalserum:

lfd. Nr. 1149	Serum v. 26. 4. 1963			
	Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
	618	570	544	538

Cholest. Synthese	%	100	92,3	88	87
Fetts. Synthese	%		84,1	80,6	78

Abb. 2
 Lfd. Nr. 1149
 Normalserum



lfd. Nr. 1142

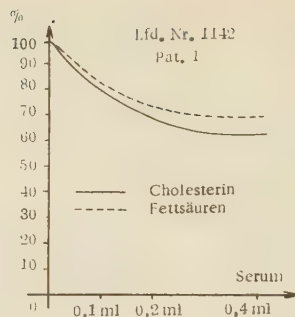
Serum vom 5.4.1963

Pat. Nr. 1

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
841	669	578	519

Cholest. Synth. %100 79,5 68,8 61,7

Fetts. Synth. % 81,7 72 69

lfd. Nr. 1152

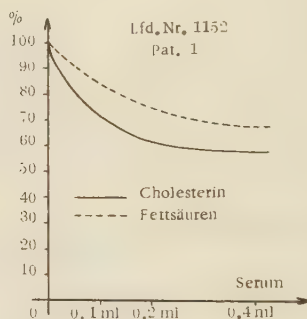
Serum vom 8.5.1963

Pat. Nr. 1

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
539	383	341	307

Cholest. Synth. %100 71 63,3 56,9

Fetts. Synth. % 89,9 74,5 67,8

lfd. Nr. 1154

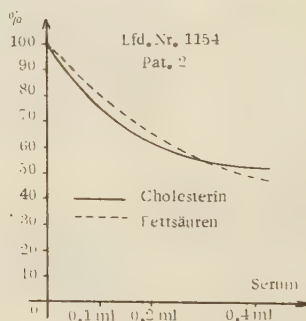
Serum vom 9.5.1963

Pat. Nr. 2

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
650	881	420	338

Cholest. Synth. %100 74 64,6 52

Fetts. Synth. 97,5 76,5 47,6



lfd. Nr. 1156

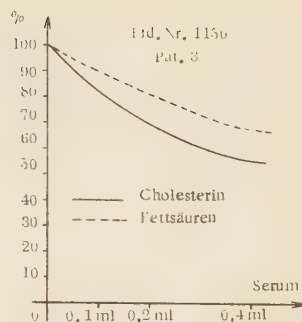
Serum vom 13. 4.

Pat. Nr. 3

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
439	363	303	239

Cholest. Synth. %100 82,7 69 54,5

Fetts. Synth. % 95,5 89,6 66,3

lfd. Nr. 1156

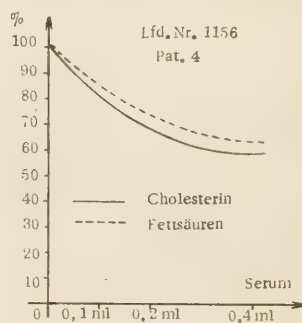
Serum vom 14. 4.

Pat. Nr. 4

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
439	353	310	255

Cholest. Synth. %100 80,5 70,6 58,2

Fetts. Synth. % 84,5 80,5 63,5

lfd. Nr. 1153

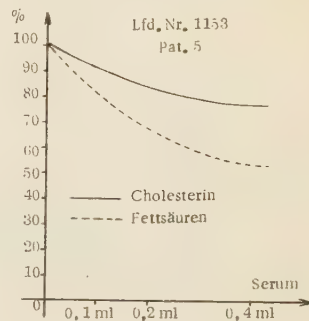
Serum vom 14. 4.

Pat. Nr. 5

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
509	474	448	395

Cholest. Synth. %100 93,1 88 77,7

Fetts. Synth. 84 68 53,2



lfd.Nr. 1159

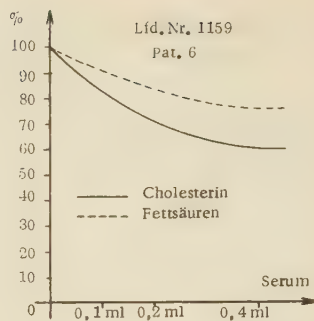
Serum vom 21.5.

Pat. Nr. 6

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
396	350	284	239

Cholest. Synth. % 100 88,3 71,6 60,7

Fetts. Synth. % 100 89,9 75,4

lfd.Nr. 1137

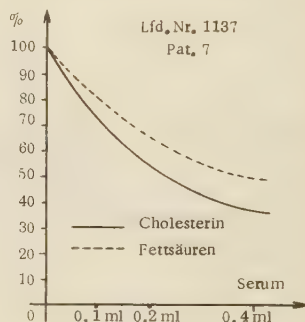
Serum vom 25.3.

Pat. Nr. 7

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
314	222	181	118

Cholest. Synth. % 100 71,7 57,6 37,7

Fetts. Synth. % 79,9 69 49,3

lfd.Nr. 1142

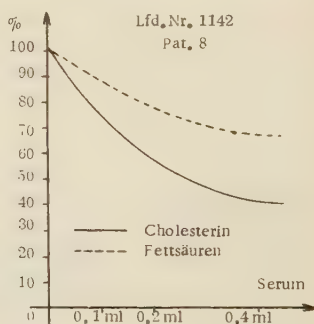
Serum vom 5.4.

Pat. Nr. 8

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
841	632	488	345

Cholest. Synth. % 100 75,2 58,1 41

Fetts. Synth. % 91,8 80 66,7



lfd.Nr. 1148

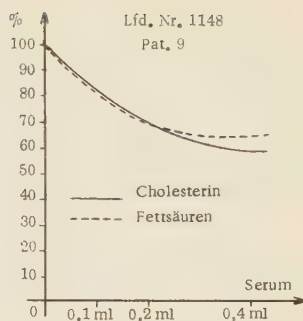
Serum vom 25.4.

Pat. Nr. 9

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
219	191	159	129

Cholest. Synth. %100 82,2 72,6 58,9

Fetts. Synth. % 81,9 71,3 67,5

lfd.Nr. 1151

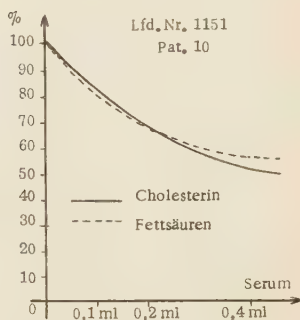
Serum vom 3.5.

Pat. Nr. 10

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
318	264	211	164

Cholest. Synth. %100 83 69,5 51,7

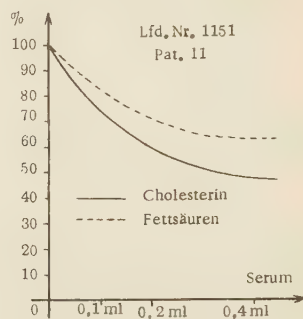
Fetts. Synth. % 81,5 74,8 56,1

lfd.Nr. 1151

Serum vom 3.5.

Pat. Nr. 11

Sup	0,1ml	0,2ml	0,4ml
318	234	175	148

Cholest. Synth. %100 73,7 55 46,6
84 69 63

lfd. Nr. 1160

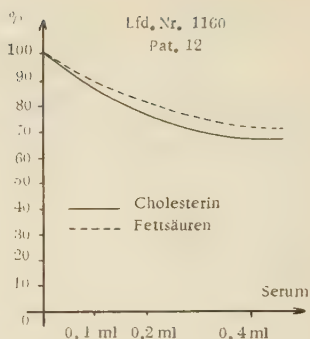
Serum vom 24. 5.

Pat. Nr. 12

Sup	0, 1ml	0, 2ml	0, 4ml
540	524	443	359

Cholest. Synth. %100 97,1 82,1 66,5

Fetts. Synth. % 99,6 85,3 71,6



lfd. Nr. 1162

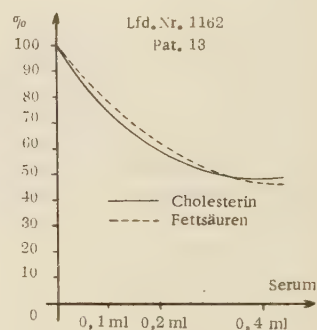
Serum vom 28. 5.

Pat. Nr. 13

Sup	0, 1ml	0, 2ml	0, 4ml
638	485	375	309

Cholest. Synth. %100 76 58,7 48,5

Fetts. Synth. % 81,2 62,1 47,5



Die Tabelle II zeigt die Höhe der Cholesterin- und Fettsäuresynthesehemmung in Abhängigkeit von der zugesetzten Serummengende. Die maximale Hemmung wurde mit 0,4 ml Serum erzielt. Stärkere Konzentrationen vermochten die Cholesterinsynthese nicht weiter zu beeinflussen, sondern bei 0,4 ml war ein konstanter maximaler Wert erreicht, wie auch die Abbildungen 2 zeigen. Durch Diabetikerseren kam eine eindrucksvolle Hemmwirkung auf den Einbau von aktivem Acetat in das Cholesterin zustande, die selbst bei 0,1 ml oft noch ausgeprägt war. Die nebenstehenden Abbildungen geben ein anschau-

liches Bild von dem Ausmaß der Hemmung und zeigen wieder ausgesprochene Parallelität zwischen Cholesterin- und Fettsäuresynthese.

Wenn man die Angaben über die Diabetesanamnese liest und die symptomatischen Blut- und Harnbefunde der einzelnen Patienten betrachtet, wird erkennbar, daß sich eigentlich keine klaren Beziehungen zwischen Schweregrad des Diabetes und hemmender Wirkung des betreffenden Serums aufzeigen lassen. Dazu muß allerdings in Rechnung gestellt werden, daß es sich bei allen um relativ gut eingestellte Patienten handelt, die in ihrer Bilanz jedenfalls im Moment vollkommen ausgeglichen sind.

Bei den ersten sechs Patienten stellten wir auch jeweils den Cholesterinspiegel des Serums fest. Die Ergebnisse bestätigen erneut, daß der Cholesteringehalt des Blutes von Diabetikern in der Regel an der obersten Grenze der zulässigen Norm liegt, oder darüber hinaus stark erhöht ist.

B. In - vivo - Versuche

Bei den in - vitro - Versuchen hatte man die Möglichkeit, Effekte durch Zugabe von Testsubstanzen auf den Acetat-Einbau mit einem Ausgangswert vergleichen zu können.

Dagegen gibt es bei den in-vivo-Versuchen keine direkten Vergleichsmöglichkeiten der Ausbeuten an eingebautem Acetat mit irgendwelchen Normalwerten.

Man kann nur ungefähr den Durchschnitt der Aktivitäten, der sich aus der Untersuchung einer größeren Anzahl von Tauben ergibt, als Maßstab für die in-vivo-Versuche nehmen. Deshalb haben wir den Wert, den wir aus dem durchschnittlichen Gehalt an radioaktivem Cholesterin aus 10 Lebern unbehandelter Tauben, die ebenfalls vor Versuchsbeginn radioaktiv markiertes Acetat instilliert bekamen, ermittelten, als Ausgangswert ($\approx 100\%$) genommen und alle folgenden Versuchsergebnisse damit verglichen.

Tabelle III Durchschnittlicher Gehalt an Cholesterin (radioaktiv markiert) aus Lebern unbehandelter Tauben.

lfd. Nr.	Imp./min
10	810
11	537
12	765
13	635
14	698
15	210

lfd. Nr.	Imp./min
16	829
20	380
21	654
22	642
insgesamt	6160 Imp./min
Mittelwert	616 Imp./min

Alle weiteren prozentualen Hemmungen beziehen sich auf diesen Durchschnittswert.

Die in-vivo-Versuche sollten eine Bestätigung der in-vitro-gefundenen Ergebnisse bringen.

Dazu injizierten wir Tauben das besonders stark hemmende α -Globulin bovin und das sich in früheren Versuchen ebenfalls als sehr wirkungsvoll erwiesene Hühnereiweiß in die Brustmuskulatur. (Das Eiklar enthält sehr viele Bestandteile, die für sich genommen schon intensiv hemmen, z.B. Albumin, wie wir in vitro gezeigt haben, vor allem aber Avidin in hohem Maße, das man wahrscheinlich als den wichtigsten hemmenden Faktor im Eiklar ansehen muß.)

Wir haben deshalb das gesamte Hühnereiweiß eingesetzt, unabhängig von den einzelnen hemmenden Fraktionen, weil wir damit eine Substanz in der Hand hatten, von der wir sicher wußten, daß sie gut hemmt. Sie lieferte somit eine Vergleichsbasis für andere Versuche, besonders für die später folgenden Zeitversuche.

Das Cholesterin wurde aus den Leberhomogenaten herausgelöst und seine Aktivität gemessen. In dem Ausmaß, wie die Aktivität des erhaltenen Cholesterins der getesteten Tauben von der aus Durchschnittswerten gewonnenen Ausgangsaktivität von Normaltauben abweicht, kann man von einer Hemmung der Synthese sprechen.

Tabelle IV zeigt den Einfluß von Eiklar und α -Globulin bovin, welche den Tauben eingespritzt wurden, auf die Cholesterinsynthesefähigkeit ihrer Lebern.

Testversuch A

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| 1. 2 x 0,5ml Hühnereiweiß | } morgens und abends
am Vortage |
| 2. 2 x 50mg α -Globulin bovin | |

1. lfd. Nr.	Imp./min
23	280
24	652
25	419
26	425
Summe	1776
Mittel	444
%	72

2. lfd. Nr.	Imp./min
33	427
34	403
36	372
40	303
Summe	1505
Mittel	376
%	61

Testversuch B

- | | | |
|--------------------------------------|---|--|
| 1. 3 X 0,5 ml Hühnereiweiß | } | morgens und abends am Vortage
und 1 Std. vor Versuchsbeginn |
| 2. 3 x 50mg α -Globulin bovin | | |

1. lfd. Nr.	Imp. /min	2. lfd. Nr.	Imp. /min
27	329	37	203
29	227	38	375
30	235	41	367
31	218	42	306
Summe	1009	Summe	1251
Mittel	252	Mittel	313
%	40,8	%	50,8

Als in ihrer Synthesefähigkeit erheblich herabgesetzt erwies sich die Taubenleber durch Gaben von 1 ml Hühnereiweiß oder 100 mg α -Globulin bovin am Vortage. Noch ausgeprägter zeigte sich diese Hemmung, wenn man eine Stunde vor Versuchsbeginn jeweils noch die halbe Menge zusätzlich spritzte. Dann erzielten wir mit Hühnereiweiß eine Hemmung auf 40%, mit α -Globulin bovin auf 50 % des Ausgangswertes. (Die Hemmungen waren also nicht ganz so stark wie bei den in-vitro-Versuchen.)

Zeitversuche:

Tabelle V zeigt die Abhängigkeit der Cholesterinsynthesehemmung in der Leber von der Wirkdauer der Testsubstanz Eiklar.

C = 1 Std. vor Vers. Beginn	}	wurden 0,5 ml Hühnereiweiß gespritzt
D = 2 " " " "		
E = 4 " " " "		
F = 12 " " " "		

C. lfd. Nr.	Imp./min
43	477
45	148
51	375
Summe	1000
Mittel	333
%	54

D. lfd. Nr.	Imp./min
54	217
55	549
Summe	766
Mittel	383
%	62,6

E. lfd. Nr.	Imp./min
52	302
62	598
Summe	900
Mittel	450
%	73

F. lfd. Nr.	Imp./min
44	636
46	512
Summe	1148
Mittel	574
%	93,1

Um zu erfahren, in welcher Zeit nach der Behandlung die maximale Hemmung zu erwarten ist, untersuchten wir die mit 0,5 ml Hühnereiweiß gespritzten Tauben eine-zwei-vier- und zwölf Stunden später.

Dabei machten wir die merkwürdige Feststellung, daß bereits eine Stunde nach Verabreichung der Hemmsubstanz der größte Einfluß auf die Synthese erreicht ist, die dann nach zwei-vier- und zwölf Stunden allmählich wieder zu Ausgangswerten zurückkehrt.

Diese Ergebnisse sind allerdings mit einem gewissen Vorbehalt zu betrachten, weil jeweils nur zwei Tauben eingesetzt wurden. Um tatsächlich eine beweiskräftige Aussage machen zu können, müßten noch in weiteren Parallelbestimmungen die Daten überprüft werden, zumal wir ja wissen, daß die individuelle Schwankungsbreite oft ein erhebliches Ausmaß annimmt.

Tabelle VI zeigt als Ergänzung zum Testversuch C, Tabelle V, die Ergebnisse mit verschiedenen anderen Substanzen.

lfd. Nr.	gespritzte Substanz	Zeitpunkt	Imp./min	%
47	50 mg Albumin hum.	1 Stunde	461	74,9
48	50 mg Albumin bov.	vor	592	96
49	0,5 ml Aqua dest.	Versuchs-	608	98,8
50	0,5 ml phys. NaCl	beginn	558	90,5

Jetzt interessierte es uns natürlich festzustellen, ob die Wirkung nach einer Stunde nicht einfach auf einem "Spritzeffekt" beruhen könnte. In derselben Versuchsanordnung spritzten wir deshalb Tauben mit Substanzen, von denen wir nach bisherigen Erfahrungen annehmen konnten, daß sie keinen Einfluß auf die Synthese haben würden.

Da sich in der Tat nach einer Stunde keinerlei Hemmung zeigte, konnte die Vermutung "Spritzeffekt" somit ausgeschlossen werden. Es handelt sich also doch um eine echte Hemmwirkung innerhalb der ersten Stunde, in der die entsprechenden Eiweißkörper maßgeblich in die Synthese eingreifen.

Nur das Albumin human hatte nach einer Stunde geringfügig gehemmt, aber das bestätigt nur das gleiche Ergebnis in vitro.

Serumcholesterinbestimmung

Um auch für das Serumcholesterin einen brauchbaren Bezugswert zu haben, bestimmten wir den durchschnittlichen Cholesteringehalt im Serum von 20 unbehandelten Tauben und setzten diesen Wert als Ausgangswert gleich 100%.

Tabelle VII Durchschnittlicher Gehalt an Cholesterin im Serum von 10 Normaltauben und 10 ungespritzten aber mit Na-C¹⁴-Acetat gefütterten Tauben.

<u>Normaltauben</u>		<u>Stoffwechseltauben</u>	
lfd. Nr.	mg %	lfd. Nr.	mg %
1	413	3	447
2	389	4	383
3	361	7	494
4	476	10	368
5	384	11	280
6	502	12	400
7	391	13	419
8	388	14	387
9	447	21	428
10	417	22	479
Summe	4168	Summe	4085
Mittel	417	Mittel	409

gemeinsamer Mittelwert 413 mg %

Alle weiteren prozentualen Hemmungen beziehen sich auf diesen Durchschnittswert.

Tabelle VIII zeigt den Einfluß von Eiklar und α -Globulin bovin, welches den Tauben eingespritzt wurde, auf den Cholesterin-gehalt des Serums.

Testversuch A

1. 2 x 0,5 ml Hühnereiweiß
2. 2 x 50 mg α -Globulin bovin

morgens und abends
am Vortage

1. lfd. Nr.	mg %
23	386
24	400
25	425
26	393

2. lfd. Nr.	mg %
33	359
34	390
36	325
40	309

Summe	1604
Mittel	401
%	97

Summe	1383
Mittel	346
%	83,6

Testversuch B

1. 3 x 0,5 ml Hühnereiweiß
2. 3 x 50 mg α -Globulin bovin

morgens und abends am Vortage
und 1 Std. vor Versuchsbeginn.

1. lfd. Nr.	mg %
27	325
29	569
30	237
31	408

2. lfd. Nr.	mg %
37	498
38	286
41	326
42	477

Summe	1539
Mittel	385
%	93,1

Summe	1587
Mittel	397
%	96

Zeitversuche:

Tabelle IX zeigt die Abhängigkeit des Serum-Cholesterins von der Wirkdauer der Testsubstanz Eiklar.

C = 1 Stunde vor Vers. Beginn
D = 2 " " " "
E = 4 " " " "
F = 12 " " " "

wurden 0,5 ml Hühnereiweiß
gespritzt

C. lfd. Nr.	mg %
43	391
45	188
51	476

Summe	1055
Mittel	352
%	85

E. lfd. Nr.	mg %
52	379
56	411

Summe	790
Mittel	395
%	95,5

D. lfd. Nr.	mg %
54	386
55	401

Summe	787
Mittel	393
%	95

F. lfd. Nr.	mg%
44	398
46	374

Summe	772
Mittel	386
%	93,5

Tabelle X zeigt als Ergänzung zum Testversuch C, Tabelle IX, die Ergebnisse mit verschiedenen anderen Substanzen.

lfd. Nr.	gespritzte Substanz	Zeitpunkt	Imp. /min	%
47	50 mg Albumin hum.	1 Stunde	373	90,3
48	50 mg Albumin bov.	vor	407	98,5
49	0,5 ml Aqua dest.	Versuchs-	520	126
50	0,5 ml phys. NaCl	beginn	359	87

Aus diesen Befunden (Tabelle VIII - X) geht hervor, daß im Gegensatz zum Lebercholesterin das Blutcholesterin etwa auf dem gleichen Stand von annähernd 100 % gehalten wird. Weder mit Konzentrations- noch mit Zeitversuchen ließ sich ein gravierendes Absinken des Spiegels erreichen.

Auf Abbildung 3 und 4 wird dieses Verhalten zur Veranschaulichung noch einmal graphisch dargestellt und zwar im Vergleich zu den entsprechenden Veränderungen des Lebercholesterins.

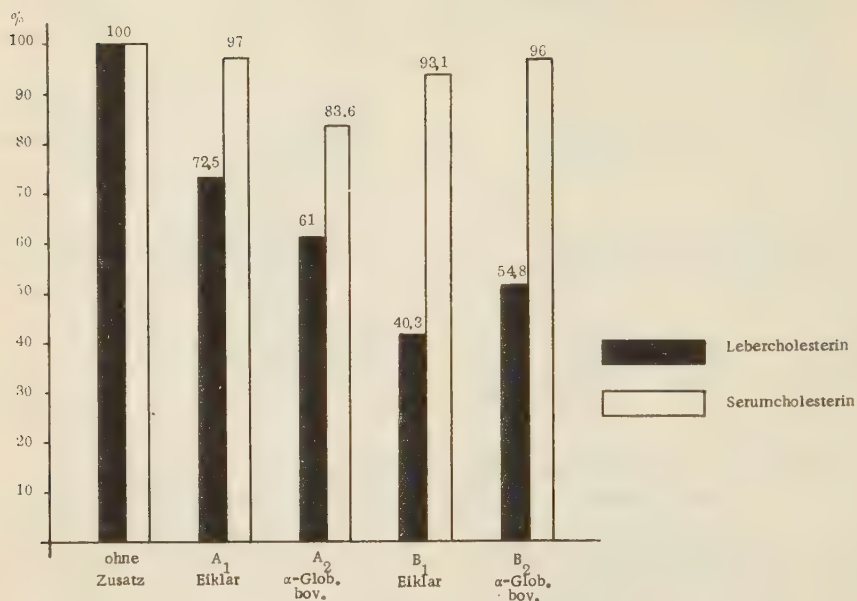


Abb. 3 Ausbeute an radioaktiv markiertem Lebercholesterin in Prozent der Synthese eines ermittelten Normalwertes in Abhängigkeit von gespritztem Eiklar und α -Glob. bovin. Zum Vergleich zeigen die nebenstehenden Säulen die Ausbeute an Serum - Cholesterin der gleichen Versuchstauben, ebenfalls in Prozent eines ermittelten Normalwertes.

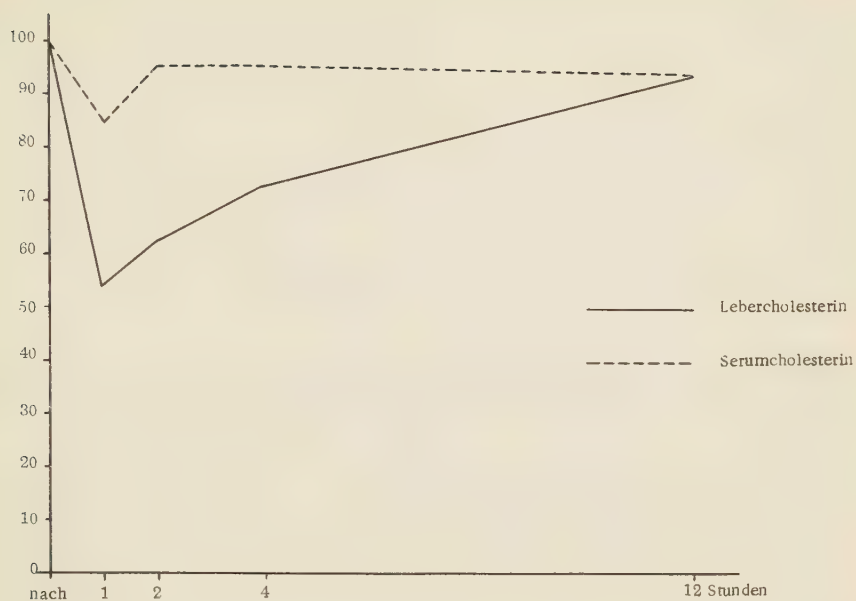


Abb. 4 Abhängigkeit der hemmenden Wirkung von 0,5 ml Hühner-eiweiß vom Zeitpunkt der Injektion

IV DISKUSSION

Wie wir im vorhergehenden gesehen haben, läßt sich mit Serum-Proteinen und Diabetikerseren die Cholesterinsynthese hemmen. Natürlich interessiert auch hier wieder in besonderem Maße die Frage, an welcher Stelle dieser Hemmungsmechanismus einsetzt. Der Befund, daß sowohl die Synthese des Cholesterins, als auch die Synthese der Fettsäuren gleichermaßen betroffen ist, legt die Vermutung nahe, daß der Angriffspunkt an einem gemeinsamen Schritt ansetzen muß. Seit den Untersuchungen von LANGDON und BLOCH (23-25) weiß man, daß das Acetacetyl-CoA ein Vorläufer beider Synthesen ist, so daß ein Eingreifen an dieser Stelle beide Gruppen treffen muß.

Entgegen den bisherigen Anschauungen wurde neuerdings von BRODIE (zit. n. 52) die Möglichkeit erwogen, daß ebenso wie die Fettsäuresynthese auch die Synthese von HMG-CoA aus Acetacetyl-CoA über Malonyl-CoA läuft. Im Falle eines derartigen Mechanismus würde das Enzym Acetylcarboxylase als weiterer gemeinsamer Angriffspunkt einer gleichzeitigen Hemmung in den Bereich der Überlegung rücken. In der Fettsäuresynthese kommt der Acetylcarboxylase, die die enzymatische Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA katalysiert, als regulatorischer Kraft besondere Bedeutung zu, weil diese Umwandlung der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt des Reaktionsablaufs ist.

Die einzelnen Eiweißkörper hemmten unterschiedlich, bei einigen war die Wirkung sehr stark ausgeprägt, bei manchen wurde kaum ein Effekt erzielt. Auch die gleichen Eiweißfraktionen verschiedener Herkunft zeigten ganz verschiedene Einflußgrade.

Diese Diskrepanz läßt sich vielleicht daraus ableiten, daß die Proteine keine einheitlichen, in ihrer Zusammensetzung konstanten Stoffe sind, sondern in sich unhomogene Verbindungen.

Es gälte zu klären, ob die Hemmwirkung durch die Proteine selbst erfolgt, oder durch ihre Abbauprodukte bedingt ist. Aus Versuchen, bei denen die Aufnahme markierter Aminosäure untersucht wurde, geht hervor, daß die Plasmaproteine sehr aktiv am Stoffwechsel teilnehmen.

Es wäre also denkbar, daß während der Synthese des Cholesterins und der Fettsäuren C_2 -Bruchstücke aus den abgebauten Proteinen

eingebaut werden können. Aber in unseren Ansätzen ist immer Acetat im Überschuß, in Form von $1 - C^{14} - Na - \text{Acetat}$ vorhanden, so daß das Gleichgewicht kaum auf der Seite des Abbaues liegen dürfte. Wäre es möglich den Abbau der Proteine zu unterbinden, müßte die synthesehemmende Wirkung ausgeprägter werden, wenn sie durch das Vorhandensein der einzelnen Proteinkörper selbst bedingt ist.

Vorstellbar wäre auch, daß es an irgendeiner Stelle zu einer konkurrierenden Fermenthemmung kommt, eventuell durch Komplexbildung.

Wie schon vorhin betont, muß bei diesen Spekulationen stets bedacht werden, daß die eingesetzten Albumine und Globuline sehr komplexer Natur sind, mit vielfältigen biologischen Eigenschaften.

Eine der wichtigsten Funktionen des Albumins ist seine Fähigkeit Stoffe, besonders negativ geladene binden zu können, daher seine Vehikel-Funktion. Beispielsweise halten die Albumine höhere Fettsäuren im Organismus gebunden.

Unter den α - und β -Globulinen finden sich Glyco- und Lipoproteide. Die letzteren haben vermutlich am Transport der wasserunlöslichen Lipide und Sterine wesentlichen Anteil, mit denen sie sich zu löslichen Komplexen verbinden. Ihr Lipidanteil besteht bis zu 30% aus Cholesterin.

Möglicherweise ist einer dieser Eigenschaften der Einfluß auf die Cholesterin- und Fettsäuresynthese zuzuschreiben. Über welchen Chemismus sie wirken, und über die Art des Angriffspunktes ist bisher noch kaum etwas bekannt.

Bei den in-vivo-Versuchen fanden die in-vitro-gefundenen Ergebnisse eine ungefähre Bestätigung. Durch die individuelle Schwankungsbreite bedingt können in vivo natürlich Verschiebungen auftreten.

Überraschend war der Befund, daß die intensivsten Hemmungen des Lebercholesterins bereits nach einer Stunde Wirkdauer auftraten. Daß es sich nicht um einen sogenannten "Spritzeffekt" handelt, konnten wir mit Substanzen nachweisen, die in vitro keinen Einfluß auf die Synthese ergeben hatten. Eine Stunde nachdem diese eingespritzt waren, fanden wir in den Lebern noch völlig normale Cholesterinwerte. Damit entfällt also der Verdacht: "nur ein Spritzeffekt". Wenn man noch bedenkt, daß die Halbwertszeit für Taubencholesterin mindestens vier Tage beträgt, so werden diese Ergebnisse, durch Reihenversuche erhärtet, vollends unerklärlich.

Daß die Cholesterinwerte im Serum bei der kurzen Versuchsdauer

nicht absinken würden, war zu erwarten. Durch Selbstregulation sucht der Organismus, solange noch Reserven vorhanden sind, den Serumspegel konstant zu halten. Im Hunger beginnt er auch erst nach relativ langer Zeit abzufallen, wenn die letzten Bestände erschöpft sind.

Dafür, daß Diabetikerseren einen nachweislichen Einfluß auf die Synthesefähigkeit der Leber haben, gibt es vielleicht schon eher eine Erklärungsmöglichkeit. Auf der Suche nach Ursachen der Hemmung der Cholesterinsynthese im Hunger und bei Diabetes untersuchten WIELAND und Mitarbeiter (51, 52) den Einbau von C^{14} -Acetat in das Cholesterin an Leberschnitten und partikelfreien Leberhomogenaten alloxan-diabetischer Ratten im akuten-Übergangs- und chronischen Stadium. Dabei stellten sie fest, daß sowohl die Fettsäuresynthese, als auch die Cholesterinsynthese in den Leberschnitten im akuten Stadium beinahe auf 0 % zurückgeht, und in den Leberextrakten auf 40%. (Diese Zahl entspricht etwa auch unseren Ergebnissen.) Als Gradmesser für die Ketose prüften sie gleichzeitig den Blutacetatpegel und fanden eine deutliche Abhängigkeit der Hemmung von der Menge des vorhandenen Acetats. Schon eine Konzentration von 1mg % ließ die Syntheserate beinahe maximal absinken. Dabei verhielten sich im akuten Stadium Fettsäure- und Cholesterinsynthese völlig gleichsinnig, während im chronischen Stadium allein die Fettsäuresynthese betroffen blieb, und die Cholesterinsynthese nach Überwindung der akuten Phase vollständig zur Norm zurückkehrte. Ihre Vermutung, daß die Acetessigsäure selbst den Aufbau der Lipide unterdrücke, fanden sie zunächst durch entsprechende Versuche bestätigt. (Absolut gereinigtes Acetacetat erwies sich dann allerdings als nicht hemmend.)

Das würde für unsere Versuche bedeuten, daß die Hemmungsergebnisse, die wir mit den eingesetzten Diabetikerseren erzielten, vielleicht auch auf dem Gehalt dieser Seren an Acetacetat beruhen. Nun haben wir das Blut von Diabetikern verwendet, die sich nach der Abgrenzung der oben referierten Formen im chronischen Stadium befinden. In diesem Stadium fanden wir ebenfalls im Gegensatz zu WIELAND die Hemmung evident. Eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe des Blutzucker- und Harnzuckergehalts und dem Aceton im Harn ließ sich nicht feststellen. Den Acetessigsäurespiegel im Serum konnten wir nicht untersuchen, so daß uns diese Vergleichsmöglichkeit fehlt.

Im Diabetes steigt aber zugleich mit dem Acetessigsäurespiegel

auch das Cholesterin im Serum an - bei unseren Patienten waren die Spiegel mit 250-300 mg% deutlich erhöht -, und zwar sind die Cholesterinbefunde umso höher, je mehr die Leber Acetessigsäure bildet.

Dieser Befund widerspricht der Theorie, daß das Acetacetat, wie im Experiment, die Ursache ist, die die Cholesterinsynthesefähigkeit der Leber herabsetzt. Die Klärung der Aufgabe der Acetessigsäure in der Leber, hat auch ein neues Licht auf die Ketogenese und gesteigerte Cholesterinbildung im diabetischen Organismus geworfen. LYNEN (21) hat eine einleuchtende Erklärung gebracht, weshalb möglicherweise die Cholesterinsynthese durch den vermehrten Acetessigsäureanfall bei der Zuckerkrankheit gefördert und nicht gehemmt wird.

Das HMG' CoA, die unmittelbare Vorstufe der Acetessigsäure ist das Bindeglied zwischen Acetyl-CoA und den Steroiden.

Wenn man annimmt, daß mit der stark erhöhten Acetessigsäurebildung in der diabetischen Leber eventuell auch der HMG-CoA-Gehalt über die Norm ansteigt, dann könnte verständlich werden, daß unter diesen Umständen die Cholesterinsynthese, die vom gleichen Zwischenprodukt ausgeht, angeregt wird.

Demzufolge wäre vielleicht der hohe Cholesteringehalt selbst als Hemmursache anzuschuldigen. Versuche von SIEPERSTEIN (33) haben den Hemmechanismus bereits aufgeklärt

Die Versuchsergebnisse mit Diabetikerseren auch an in-vivo Verhältnissen zu überprüfen, muß nachfolgenden Experimenten überlassen bleiben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde in vitro und in vivo der Einfluß der Plasma-Eiweißfraktionen auf die Cholesterinsynthese untersucht, zusätzlich noch in vitro die Wirkung von Diabetikerseren.

A. In - vitro - Versuch

Mit Hilfe eines cholesterinsynthetisierenden Fermentextraktes, präpariert aus Taubenlebern, konnte gezeigt werden, daß:

1. der Acetateinbau in Cholesterin stark gehemmt wurde
 - a durch α -Globulin bovin auf 32 %
 - b durch Eialbumin " 30 %
 - c durch β -Globulin human " 50% und bovin auf 52 %
2. eine mäßige Hemmwirkung erzielt wurde
 - a durch Albumin human auf 71 %
 - b durch α -Globulin human " 78 %
 - c durch γ -Globulin bovin " 74 %
3. überhaupt kein Einfluß bewirkt wurde
durch Albumin bovin auf 95 %
4. unter der Wirkung von Diabetikerseren eine ausgeprägte Hemmung sich herausstellte, deren Grad abhängig von der zugegebenen Menge des Serums war, und die nach Erreichung eines Maximums konstant blieb.

B. In - vivo - Versuche

Beim Studium der Verhältnisse am lebenden Organismus konnte an Tauen gezeigt werden, daß:

1. der Acetateinbau in das Cholesterin der Leber ebenfalls stark gehemmt wurde
 - a durch α -Globulin bovin auf 60 % bw. 50 %
 - b durch Hühnereiweiß auf 70 % " 40 %
2. die Hemmung an Intensität zunahm durch Erhöhung der Konzentration dieser Stoffe und nach Erreichung eines Maximums konstant blieb.
3. sich eine deutliche Abhängigkeit des Effektes von der Zeit herausstellte; denn nach einer Stunde Wirkungsdauer ergab sich die stärkste Hemmwirkung, die allmählich abklang
4. ein gravierender Einfluß auf den Cholesteringehalt des Serums, trotz Erhöhung der Konzentration, auch bei Untersuchung nach bestimmten Zeiteinheiten nicht auftrat.

Diese Arbeit wurde in der Medizinischen Poliklinik in München unter der Leitung von Professor Dr. W. SEITZ im Isotopenlabor unter der Leitung von Dr. phil. et med. Vera von BRAND-NAGENGAST ausgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. SEITZ für das Überlassen des Themas.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. phil. et med. Vera BRAND-NAGENGAST, die mir bei allen Arbeiten unermüdlich ratend und helfend zur Seite stand.

Nicht zuletzt gebührt großer Dank auch der med. techn. Assistentin Fräulein Heide Wilde, für ihre tatkräftige Mithilfe.

VI. LITERATURANGABEN

1. Heilmeyer, L.: Lehrbuch der inneren Medizin, Berlin 1961
2. Reisert, P.M:
 in Heilmeyer: Lehrbuch der spez. path. Physiologie, Stuttgart 1960
3. Zöllner, N.: Der Cholesterinstoffwechsel in Tannhauser: Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten, Stuttgart 1957
4. Schettler, G.: Arteriosklerose und Cholesterinstoffwechsel, dtsch.med. Wschr. 78, 989 1953.
5. Schettler, G.: Arteriosklerose, Stuttgart 1961, 576 ff.
6. Schettler, G.: Arteriosklerose, Klin.d.Gegw. II, S. 275, 1960 und Ergänzung 1963.
7. Schrade, W.: Über die Polyensäuren des Blutes in: Arteriosklerose und Ernährung. 2. Symposion in Bad Neuenahr Darmstadt 1959, S. 115, Fischer, F. W.: " " , S. 127.
8. Schrade, W.:
 Biegler, R.:
 Böhle, E.: Über Veränderungen des Blutfettsäuregehaltes bei der Arteriosklerose und ihre Bedeutung für die Therapie. Dtsch. med. Wschr. 83, 1355/1396, 1959
9. Wenge, R.: Prophylaxe der Arteriosklerose. Dtsch. med. Wschr. 387, I., 1961.
10. Zöllner, N.: Arteriosklerose, Stoffwechsel und Ernährung. Mü. med. Wschr. 100, 365, 1957.
11. Zöllner, N.: Normalwerte der Plasmalipide. Dtsch. med. Wschr. 386, 1959.

12. Glatzel, H.: Nahrungsfett und Herzinfarkt
Dtsch. med. Wschr. 85, 1296,
1960
13. Keys, A.: Entgegnung auf Glatzel
Dtsch. med. Wschr. 87, 2490, 1961
14. Schön, H.: Zur Frage der Verwendung von Ölen
in der diätetischen Therapie degen.
Gefäßerkrankungen.
I Med. Klin. 54, 1394, 1959
II Med. Klin. 55, 260, 1960
15. Schön, H.: Die Klärinsuffizienz als pathogene-
tisches Prinzip der Arteriosklerose
Med. Klin. 55, 2195, 1960
16. Leuthardt, F.: Lehrbuch der physiologischen Che-
mie, Berlin 1959.
17. Karlson, D.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie,
Stuttgart 1961
18. Henning, U.: Die Biosynthese des Cholesterins
Dtsch. med. Wschr. 84, 760, 1959.
19. Popjak, G.: Studies on the biosynthesis of Cho-
lesterol. J. biol. Chem.
 II. 236, 1934, 1961
 III. 236, 2896, 1961
 IV. 237, 56, 1962
20. Avigan, J.: Studies of Cholesterol biosynthesis
 Steinberg, D.: J. biol. Chem., 235, 3123/3127,
 Vroman, H.E.: 1960
21. Lynen, F.: Mechanismus der Acetessigsäure-
 Henning, U.: bildung in der Leber.
 Biochem. Z. 330, 269, 1958
22. Rabinowitz, J.L.: Biosynthesis of Cholesterol and
 Gunin, S.: beta-hydroxy-beta-methyl-glutaric
acid by extracts of liver.
J. biol. Chem. 208, 307, 1954
23. Langdon, R.G.: The biosynthesis of Squalene
 Bloch, K.: J. biol. Chem. 200, 129, 1953

24. Langdon, R.G.:
Bloch, K.: The utilisation of Squalene in the biosynthesis of Cholesterol
J. biol. Chem. 200, 135, 1953
25. Langdon, R.G.:
Bloch, K.: The effect of some dietary additions on the synthesis of Cholesterol from Acetat in vitro.
J. biol. Chem. 202, 77, 1953
26. Tshen, T.T.:
Bloch, K.: On the conversation of Squalene in the biosynthesis of Cholesterol
J. biol. Chem. 226, 921, 1957.
27. Lynen, F.:
Agranoff, B.W.: Der Weg der Squalensynthese
Angew. Chemie 71, 661, 1959
28. Childs, R.C.:
Bloch, K.: Further observations on the biosynthesis of Squalene
J. biol. Chem. 237, 62, 1962
29. Ruzicka, C.: The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds
Experientia 9, 357, 1953
30. Clayton, R.:
Bloch, K.: The biological conversation of Lanosterol to Cholesterol
J. biol. Chem. 218, 319, 1956
31. Schön, H.:
Henning, U.: Untersuchungen zur Regulation des Cholesterinstoffwechsels
Dtsch. med. Wschr. 31, 1385, 1959
32. Maroso, J.L.: Biochemical mechanism related to homeostatic regulation of lipogenesis in animals. J. lipid. Research 3, 149, 1962
33. Sieperstein, M.D.: The homeostatic control of Cholesterol synthesis in liver
Am. J. clin. nutr. 8, 645, 1960
34. Kl. Mitteilungen: Hemmung der Cholesterin Biosynthese zwischen Mevalon und Squalen
Dtsch. med. Wschr. II, 1889, 1961
35. Kl. Mitteilungen: Hemmung der Cholesterin Biosynthese durch Farnesylsäure
Dtsch. med. Wschr. II 1437, 1960

36. Keller, C.:
Gargelyl, J.:
Klinische Erfahrungen an Arteriosklerotikern mit dem die Biosynthese des Cholesterol vermindernenden Triparanol (Mer 29) Zeitschr. f. Inn. Med. 1962
37. v. Brand, V.:
Seitz, W.:
Einfluß gekoppelter Gallensäuren auf die Synthese der Fettsäuren
Klin. Wschr. 36, 87, 1958
38. v. Brand, V.:
Seitz, W.:
Hemmung der Synthese von Fettsäuren und Cholesterin in der Leber in vitro und Senkung des Cholesteringehaltes des menschlichen Serums durch Nicotinsäureamid. Med. Klin. 55, 723, 1960
39. Wood, J.D.:
Migicovsky, B.B.:
A possible mechanism for fatty acid inhibition of Cholesterol synthesis. Can. J. Biochem. Physiol 35, 645, 1957
40. Roscoe, J.D.:
Brady, O.:
Bradley:
Biosynthesis of fatty acids
IV Studies with inhibitors. J. lipid. Research 2, 144, 1963
41. Gries, F.A.:
Matschinsky, F.:
Wieland, O.:
Einfluß der Schilddrüse auf die Cholesterinsynthese.
Biochem. biophys. Acta 56, 615, 1962
42. Brady, R.O.:
Guin, S.:
Biosynthesis of fatty acids by cell-free or watersoluble enzyme systems. J. biol. Chem. 199, 421, 1952
43. v. Brand, V.:
Helmreich, E.:
Biochem. Z. 328, 146, 1956
44. v. Brand, V.:
Ein Beitrag zur Fettsynthese
Biochem. Z. 331, 162, 1959
45. Bucher, N.L.R.:
Frantz, jr. J.D.:
The incorporation of the Carboxyl-carbon from Acetat into Cholesterol by rat liver homogenates
J. biol. Chem. 206, 471, 1954
46. Bucher, N.L.R.:
McGarrahan, K.:
The biosynthesis of Cholesterol from Acetat $1-C^{14}$ by cellular fractions of rat liver. J. biol. Chem. 222, 1, 1956

47. Sund, Christof: Einfluß der Palmitinsäure und einiger ungesättigter Fettsäuren auf die Cholesterinsynthese in vitro
Inauguraldissertation München 1959
48. Zöllner, N.: Untersuchungen über das Verhalten der Plasmalipoide bei idiopathischer Hypercholesterinämie unter besonderer Berücksichtigung der Cholesterinester
J. klin. Chmie 1, 18, 1963
49. Sperry, W.M.: Lipide Analysis
In: Methods of Biochemical Analysis
Vol 2 Interscience Publishers
New York - London 1955
50. Zack, B.: Am. J. Clin. Path. 24, 1307, 1954
Dickenham, R.C.:
White, E.G.:
Zack, B.: Anal. Chem. 26, 776, 1954
Moss, N.:
Boyle, A.J.:
Zack, B.: J. Laborat. Clin. Med. 486, 1953
Zlatkis, A.: S. Louis
Boyle, A.J.:
51. Wieland, O.: Fettsäuresynthese in der Leber allo-
xandiabetischer Ratten.
Neufeld, I.: Biochem. Z. 336, 455, 1963
Numa, S.:
Lynen, F.:
52. Wieland, O.: Zur Hemmung der Lipidsynthese der
Eger-Neufeld, I.: Leber bei Diabetes
Biochem. Z. 337, 349, 1963

LEBENS LAUF

Am 4. August 1935 wurde ich, Brigitte Kroeger, geb. Graubner, als Tochter des prakt. Arztes Moritz Graubner aus Derpat/Estland und seiner Gemahlin Felicitas, geb. Heldt, aus Ösel/Estland in Stettin geboren.

Besuch der Volksschulen in Gartz/Oder und nach der Flucht 1945 in Edewecht/Oldb.

Beginn der höheren Schule in Oldenburg 1947. Durch Umzug meiner Eltern nach Neustadt, Krs. Marburg/L. im Jahre 1950, kam ich in die Elisabethschule, staatl. Realgymnasium für Mädchen zu Marburg, wo ich im Jahre 1956 mein Abitur machte.

Nach zweisemestrigem Studium der Germanistik und Geschichte, begann ich 1957 in Marburg Medizin zu studieren, wo ich im Herbst 1959 das Physikum machte.

Die ersten drei klinischen Semester hörte ich in der Münchener Ludwig-Maximilian-Universität, die letzten drei wieder an der Alma mater Philippina zu Marburg, wo ich Ende 1962 das Staatsexamen bestand.

Am 27. September 1963 heiratete ich den Medizinalassistenten Fritz-Jürgen Kroeger.

